

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PSIQUIATRÍA**



TESIS DOCTORAL

**Detección de beta-7-casomorfina en orina de niños con
autismo**

**PRESENTADA POR
PRADO AYALA MÚÑOZ**

Directora

Mara Parellada Redondo

Madrid, 2014

TESIS DOCTORAL: DETECCIÓN DE BETA-7-CASOMORFINA EN ORINA DE NIÑOS CON AUTISMO

Doctoranda: Prado Ayala Muñoz

Directora: Dra Mara Parellada Redondo

Departamento de Psiquiatría

Facultad de Medicina

Universidad Complutense de Madrid



AGRADECIMIENTOS

Hemos dado por terminado el texto, no así el trabajo que se ha iniciado con esta Tesis Doctoral. Y al mirar hacia atrás, se hace necesario agradecer a todas aquellas personas que han hecho posible que esta tesis se haya llevado a cabo.

Muchas personas me han empujado a llevar a cabo este proyecto. De ellos he recibido la fuerza necesaria para el trabajo del día a día. Se lo agradezco a mi hijo Francisco, que padece autismo y al que cuidamos cada día. A mi marido Manuel y al resto de mis hijos Juanjo, Rafa, Prado, Cintia y Belén. Porque todos ellos me han empujado a aprender a conocer la enfermedad de Francisco.

Y en el camino muchas personas que se han cruzado conmigo, han confiado en mí y me han dado las herramientas para poder desarrollar este trabajo. Mi agradecimiento a Mariano Alcaraz, a Celso Arango, a Javier y Cesar Nombela.

Se lo agradezco a aquellas personas que me han ayudado a entender las particularidades de los trabajos de investigación, que han colaborado conmigo codo a codo, me han animado con alegría y ayudado en momentos de agotamiento. Gracias a Marisa Giráldez y a Soledad Terrados.

A Francisco Díaz Atienza que ha contribuido con su experiencia en investigación en el campo del autismo. A María Luisa Hernández que ha trabajado en el laboratorio, dirigiendo la metodología y haciendo que la consecución de los resultados pudiera ser real.

Pero la persona que me ha dado la mano y me ha llevado por el camino de la investigación, la que ha soportado con paciencia y día a día mis debilidades y realmente me ha apoyado con confianza, la persona que ha hecho posible que este trabajo se haya llevado a cabo y haya llegado a término, es mi Directora de Tesis, la doctora Mara Parellada. Gracias Mara por tu ayuda.

Y por último a la Fundación Mutua Madrileña, gracias a cuya financiación ha sido posible desarrollar este estudio.

DEDICATORIA

A mi marido

A mis hijos

A mis padres

A Francisco y a todos los niños con Autismo

Debido a la naturaleza de esta Tesis Doctoral y según el acuerdo de la Comisión de Postgrado de la Facultad de Medicina en relación al formato de las Tesis Doctorales, hemos decidido exponer conjuntamente resultados y discusión en la estructura del presente trabajo.

La razón por la que se ha considerado hacerlo así es porque los resultados están claramente divididos en tres grandes grupos. El primero son los resultados de la puesta a punto de la técnica y que nos permitieron establecer este trabajo. El segundo son los resultados de la muestra preliminar, un subgrupo de casos y controles que se analizaron en primer lugar por razones metodológicas y de plazos y que fueron muy prometedores. Por último los resultados de la muestra completa que no consiguieron replicar los de la muestra preliminar.

Cada grupo de resultados se acompaña de su propia discusión donde se valoran los distintos factores relacionados con cada uno de ellos.

ABREVIATURAS

ADOS-R	Autism Diagnostic Observation Schedule-Revised
BHE	Barrera Hematoencefálica
BSE	Behavioral Summarized Evaluation
CARS	Chilhood Autism Rating Scale
CD	Cluster Diferentiation
CHARGE	Chilhood Autism Risks from Genetics and Enviroment
DNA	Ácido Deoxiribonucleico
DPPIV	Dipeptidil Peptidasa IV
DSM-IV TR	Diagnostic and Stadistical Manual of Mental Disorders IV Texto Revisado
ESI	ElectroSpray Ionization
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen DR
IFN	Interferón
IL	Interleuquina
IMC	Índice de Masa Corporal
K-DSADS	Kiddie Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-age children-Present and Lifetime version

LC	Cromatografía Líquida
LC-MS/MS	Cromatografía Líquida en tandem con Espectrometría de Masas
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LPS	Lipopolisacárido
LT	Linfocitos T
LTA	Ácido Lipoteicoico
LTQ	Linear Trap Quadrupole
MALDI TOF-TOF	Matrix Assisted Laser Desorbtion Ionisation-Time Of Flight Mass Spectrometry
MBP	Proteína Mielina Básica
PDD-NOS	Trastorno Generalizado del Desarrollo No Especificado
PHA	Fitoheماغلوتينina
PTS-1	Peptide Transport System-1
Roma III-QPGS	Roma III The Questionnaire on Paediatric Gastrointestinal Symptoms
RSD	Desviación Estandar Relativa
SNPs	Single Nucleotide Polimorphisms

TEA	Trastorno del Espectro Autista
TGD	Trastorno Generalizado del Desarrollo
Th1	Linfocitos T colaboradores 1
Th2	Linfocitos T colaboradores 2
TJ	Tight Junctions
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TNFR	Receptor del Factor de Necrosis Tumoral

INDICE

SUMMARY	15
RESUMEN	25
1.- INTRODUCCIÓN. ANTECEDENTES	35
1.1.- DEFINICIÓN DE LOS TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA (TEA)	39
1.2.- PREVALENCIA	45
1.3.- ETIOLOGÍA Y FISIOPATOGENIA	49
1.4.- PATOLOGÍA GASTROINTESTINAL EN LOS TEA	61
1.5.- SISTEMA INMUNE EN LOS TEA	65
1.6.- LECHE Y PROTEÍNAS DE LA DIETA EN LOS TEA	73
1.7.- HIPÓTESIS OPIOIDE EN LOS TEA	85
1.8.- DETECCIÓN DE PÉPTIDOS EN ORINA	93
2.- OBJETIVOS	101
3.- HIPÓTESIS	105
4.- MATERIAL Y MÉTODO	109
4.1.- DISEÑO DEL ESTUDIO	113
4.2.- PARTICIPANTES	117
4.3.- EVALUACIÓN CLÍNICA	125
4.4.- EVALUACIÓN BIOQUÍMICA	135
4.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	145
4.6.- ASPECTOS ÉTICOS.	147
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	149
5.1.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA. FASE 1.	153
5.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LAS ORINAS DE CASOS Y CONTROLES. FASES 2 Y 3.	169
6.- IMPLICACIONES DEL ESTUDIO	289
7.- CONCLUSIONES	293
8.- ANEXOS	299
BIBLIOGRAFÍA	377

SUMMARY

INTRODUCTION

Autism Spectrum Disorders, from now on ASDs, include a group of individuals characterized by an alteration that ranges in severity, in reciprocal social interaction skills, in verbal and non-verbal communication skills, and in symbolic and imaginative skills, associated with a restricted and repetitive repertoire of activities and interests (DSM-IV TR) (See Addendum 1).

Although the exact prevalence of this group of disorders is unclear, until recently the ratio was approximately 60-70 cases for every 10,000 general population individuals. The number of such cases has grown exponentially during the past few years. More consistent recent data indicates a prevalence of 1-1.5% of ASDs among babies born alive. Some of the contributing factors to this increase in numbers could be the actual extension of the concept, as well as diagnostic criteria expansion, services development, and improved detection of this disorder. However, it is estimated that a 45% prevalence increase is due to unexplained factors.

The clinical diversity of autism reflects a heterogeneous etiology; therefore there are numerous affecting and intervening factors. Current consensus states that this is a multifactorial disorder, with multiple converging causes whose relevance vary depending on the individual, and where both genetic and environmental factors, along with their different interactions, might play an important role.

ASDs have been associated with a larger prevalence of physical pathologies than those present in children with a normal development or even with other developmental disorders. Specifically, it seems that the digestive pathology is particularly relevant, although due to ASDs' own characteristics, evaluation of digestive symptoms is difficult given the communication problems that extend to include the inability to express sensations, like pain. Some authors have suggested that treatment of the gastrointestinal symptoms may improve the behavioral skills, or even the evolution of the autistic disease.

Intestinal samples taken from subjects with ASDs have shown an excessive presence of diverse functional pathology including constipation; abdominal pain of unknown cause; stool alterations, including consistency, color, blood, flatulence, as well as volume and odor increase. Alterations of the intestinal microflora have also been described, and changes in the digestive enzymes have been reported, with a low intestinal disaccharidase enzymes activity, low hepatic alpha-1 antitrypsin, or a diminished ability for hepatic sulphation.

On the other hand, many scholars acknowledge the presence of alterations in the immune response of ASDs. Several studies have linked autistic symptoms with higher levels of immune response mediators, relevant to the activation of antigen (monocytic) and Th2 lymphocyte line presenting cells, with altered cytokine liberation patterns, having noticed in general an increase in the proinflammatory cytokines activity along with a decrease of compensating cytokines. Apart from systemic immune system alterations, immune alterations have been noticed along the entire digestive mucosa in children with ASDs.

From a histological standpoint of the digestive system, several studies have been conducted and amongst the reported findings the following are included: eosinophilic esophagitis, chronic gastritis, or chronic duodenitis compatible with celiac disease. Some studies showed a significantly lower proinflammatory digestive cytokine activity in children with a gluten-free and casein-free diet, as well as an increase in proinflammatory cytokines when stimulating with milk and gliadin proteins.

A digestive-immune theory about autism has been created, based on current knowledge of the digestive physiology, on observed properties of derived peptides from diet proteins, as well as on known immune and digestive alterations in ASDs. An increase of the intestinal permeability has been postulated, which would lead to a breach in the intestinal barrier, with possible access of exogenous peptides, of dietetic origin, into the general circulation. This could cause a systemic immune response and an effect from the absorbed peptides onto the central nervous system.

One of the milk proteins is beta-casein, during whose intestinal degradation bioactive peptides are released, due to a process where proteolytic enzymes such as elastase, and the aminopeptidases pepsin and leukine, intervene. The most important opioid peptide derived from beta-casein in milk is Beta-Casomorphin-7, whose name derives from its exogenous origin and its morphine-like activity. This peptide has to degrade, although it is very resistant to proteolytic enzymes, thus requiring a specific enzyme for its degradation, namely the dipeptidyl peptidase-4 from the intestinal brush border cells. This

enzyme's activity can vary according to several factors, including intestinal damage or food allergy situations.

A series of studies have shown that intestinal permeability is altered in some ASDs cases. Others have studied the activity of the dipeptidyl peptidase-IV in ASDs, which is needed for the beta-casomorphin-7 organic degradation, where a lower activity than in the controls were detected.

Animal studies have shown an opioid activity of the beta-casomorphin-7, with a great affinity for mu-type opioid receptors, a lower activity for those of type delta, and even less for kappa. This activity can be modified by opioid antagonists such as naloxone. It has also been shown that the Beta-Casomorphin-7 intrathecal injection modulates social behavior and the traits for the interaction between a mother and a baby in animals, as well as other behavioral aspects.

Some studies performed with opioid antagonists in ASDs patients were inconclusive with respect to their efficacy in modifying ASD symptoms. Based on publications regarding treatment of individuals suffering from ASDs with the opioid antagonist naltrexone, it has been suggested that Beta-Casomorphin-7 could influence behavioral symptoms for this disorder. There are some studies in children with ADSs and self-injurious behavior, who were administered different quantities of naltrexone, and a decrease in symptoms was observed. These studies, however, do not follow a rigorous methodology, therefore one must exercise caution when taking their conclusions into account.

Some scholars have detected peptiduria in urine samples from children with ASDs through chromatographic techniques and assert that those urinary peptides are opioid in nature and milk-derived, and that beta-casomorphin-7 is among them. Nevertheless, chromatographic techniques are substance separation tools and are not meant for molecular identification. Subsequent studies have used such chromatographic techniques applied to spectrometric ones, in order to identify those peptides through sequencing, although the presence of beta-casomorphin-7 has not been proven, leading to the partial conclusion that those peptides derived from diet protein digestion in the urine of autistic children do not exist.

A few studies have assessed the effects of a gluten-free and casein-free diet in children suffering from ASDs that have shown an improvement in social and communication symptoms, as well as a reduction in autistic behavior and recurrence of symptoms upon discontinuation of said diet. Relying on such studies or the experience of families who hold that they noticed an improvement of the symptoms in their autistic children, many parents have chosen a gluten-free casein-free diet for their children without proper scientific support for this.

There is, however, no consistent evidence to even support the existence of an excessive absorption of opioid peptides in individuals with ASDs. There has been some research trying to prove the excessive elimination of said peptides by studying their presence in the urine of those individuals. The results are still inconclusive.

Considering the lack of proof about the presence of beta-casomorphin-7 in the urine samples and in spite of it, constant demand from the patients' parents for some sort of test that would support following a particular diet, as well as the existence of private laboratories' supplying tests to detect peptides in the urine, it seems that this type of research is still warranted.

AIM

Given the fact that ASD patients form a heterogeneous group, it is assumed that the hypothetical absorption of beta-casomorphin-7 would be greater in those individuals with ASDs associated with a chronic intestinal alteration. This study evaluates the alterations in the digestive function through the questionnaire Roma III-QPGS. 27 patients suffering from ASDs and altered gastrointestinal function, and 28 healthy controls, were recruited. Urine analysis were performed by separating chromatographic peptide separation and analysis of the alleged peptide fraction using LTQ spectrometry, a very useful spectrometric tool for a broad range of peptides and proteins that are present in biological extracts and fluids.

RESULTS

Preliminary results, including 14 samples (10 cases and 4 controls) were highly significant and encouraging, having detected beta-casomorphin-7 in 90% of the cases (9/10) and in 25% of the controls (1/4). However, when combining the samples (17 more cases and 22 more controls), there was no sign of beta-casomorphin-7 in none of them in a subsequent urine analysis of the preliminary samples, we were unable to reproduce the initial results.

CONCLUSIONS

We have been able to detect beta-casomorphin-7 in urine samples from ASDs patients, although we were not successful at replicating these results. This study analyzes possible causes for the lack of replication, possibly due to the limitations of the techniques used.

The importance of this study entails reopening the debate about the ASDs opioid peptide hypothesis. On the other hand, the results, despite the fact that they have not been replicable so far, urge for new lines of research using more appropriate techniques to detect this peptide, and for the possibility of conducting dietary interventions on ASDs patients. That could shed some light on the physiopathology of this illness.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Los trastornos del espectro autista, de aquí en adelante TEA, comprenden un grupo de individuos caracterizado por una alteración de gravedad variable, en la función de interacción social recíproca, en la comunicación verbal y no verbal y en las actividades simbólicas e imaginativas, asociada con un repertorio escaso y repetitivo de actividades e intereses (DSM-IV TR) (Ver Anexo 1).

Aunque no están claras las cifras exactas de prevalencia de este grupo de trastornos, hasta recientemente se solían dar datos de en torno a 60-70 casos por cada 10.000 sujetos de la población general. Estos valores han sufrido un aumento exponencial en los últimos años. Los datos actuales más consistentes hacen referencia a una prevalencia de 1-1,5% de TEA entre los nacidos vivos. Algunos factores que pueden haber contribuido a este aumento son la extensión del concepto, la expansión de los criterios diagnósticos, el desarrollo de los servicios y la mejoría en la detección del trastorno. Sin embargo, se calcula que un 45 % del aumento de la prevalencia no se explica por factores conocidos.

La diversidad clínica del autismo refleja una etiología heterogénea, de modo que hay múltiples factores que pueden afectar e intervenir. Actualmente el consenso es que se trata de un trastorno multifactorial, con múltiples causas convergiendo y cobrando distinta importancia en cada sujeto y donde factores genéticos, ambientales y las distintas interacciones entre ellos pueden jugar un

papel importante.

Los TEA se han asociado con una mayor prevalencia de patologías físicas de las que se presentan en niños con desarrollo típico o incluso con otros trastornos del desarrollo. En concreto, parece que la patología digestiva adquiere especial importancia, aunque debido a las características propias de los TEA, es difícil la valoración de los síntomas digestivos, dado los problemas de comunicación, que se extienden a la incapacidad de comunicar sensaciones, como el dolor. Algunos autores han sugerido que el tratamiento de los síntomas gastrointestinales podría mejorar el comportamiento o incluso la evolución del trastorno autista.

En distintas muestras de sujetos con TEA se ha observado la presencia excesiva de patología intestinal funcional variada, como estreñimiento, dolor abdominal sin causa conocida, alteraciones en las heces incluyendo la consistencia, el color, sangre, flatulencia, aumento de volumen y olor. También se han descrito alteraciones en la microflora intestinal y se han reportado alteraciones en las enzimas digestivas, con una baja actividad de enzimas intestinales disacaridasas, bajas concentraciones de alfa-1-antitripsina hepática o una menor capacidad de sulfatación hepática.

Por otro lado, muchos autores reconocen la presencia de alteraciones en la respuesta inmune en los TEA. Varios estudios asocian los síntomas autistas con mayores niveles de mediadores de la respuesta inmune, correspondientes a la activación de células presentadoras de antígeno (monocitaria) y de la línea

de linfocitos Th2, con patrones de liberación de citoquinas alterados, observándose de forma general un aumento de la actividad de las citoquinas proinflamatorias con una disminución de las citoquinas compensadoras. Además de las alteraciones inmunológicas sistémicas, se han visto alteraciones inmunes a lo largo de toda la mucosa digestiva en niños con TEA. Desde el punto de vista histológico del sistema digestivo, se han hecho diversos estudios y entre los hallazgos reportados, se incluyen esofagitis eosinofílica, gastritis crónica o duodenitis crónica compatible con enfermedad celíaca. En algunos estudios se ha reportado una actividad de citoquinas proinflamatorias digestivas significativamente menor en niños con dietas libres de gluten y caseína, así como un aumento de citoquinas proinflamatorias al estimular con proteínas de la leche y gliadina.

En base a los conocimientos actuales de la fisiología digestiva y a las propiedades observadas de los péptidos derivados de las proteínas de la dieta, así como la evidencia disponible sobre alteraciones inmunológicas y digestivas en los TEA, se ha construido una teoría digestivo-inmunitaria del autismo. Se ha postulado un aumento de la permeabilidad intestinal que conduciría a una ruptura de la función de la barrera intestinal, con una posible entrada de péptidos exógenos de origen dietético a la circulación general. Esto daría lugar a una respuesta inmunitaria sistémica y quizás a un efecto de los péptidos absorbidos sobre el sistema nervioso central.

Entre las proteínas de la leche se encuentra la beta-caseína, en cuya degradación intestinal, por un proceso en el que intervienen enzimas

proteolíticas, entre las que están la elastasa y las aminopeptidasas pepsina y leucina, se liberan péptidos bioactivos. El péptido opioide derivado de la beta-caseína de la leche más importante es la beta-7-casomorfina, llamado así debido a su origen exógeno y a su actividad similar a la morfina. Este péptido debe degradarse, pero es muy resistente a las enzimas proteolíticas y su degradación requiere una enzima específica, la dipeptidil-peptidasa IV de las células de cepillo intestinales. La actividad de esta enzima puede variar en función de una serie de factores, entre los que están el daño intestinal o situaciones de alergia alimentaria.

Algunos autores han mostrado que la permeabilidad intestinal está alterada en algunos casos con TEA. Otros autores han estudiado la actividad de la dipeptidil peptidasa IV en los TEA, necesaria para la degradación orgánica de la beta-7-casomorfina, observándose una actividad menor que en controles.

En estudios animales se ha visto que la beta-7-casomorfina presenta actividad opioide, con alta afinidad por los receptores opioides cerebrales de tipo mu, menor por los delta y aún menor por los kappa. Esta actividad puede ser modificada por antagonistas opioides como la naloxona. También se ha visto que la inyección intratecal de beta-7-casomorfina modula el comportamiento social y las características de la interacción madre-cría en animales, así como otros aspectos del comportamiento.

Se han hecho estudios con antagonistas opioides en pacientes con TEA, con resultados inconcluyentes. Basándose en publicaciones en relación a

tratamientos de sujetos con TEA con el antagonista opioide naltrexona, se ha pensado que la beta-7-casomorfina podría influir en los síntomas comportamentales de este trastorno. Hay estudios en niños con TEA y comportamiento autolesivo a los que se les administró naltrexona en distintas dosis y se observó una reducción de los síntomas, aunque estos trabajos no siguen una metodología muy rigurosa, de modo que hay que tomar sus conclusiones con cautela.

Algunos autores que han encontrado peptiduria en orinas de niños con TEA mediante técnicas cromatográficas, mantienen que dichos péptidos urinarios son de naturaleza opioide y derivados de la leche y que entre ellos está la beta-7-casomorfina. Sin embargo, las técnicas cromatográficas son herramientas de separación de sustancias pero no de identificación molecular. En estudios posteriores se han utilizado dichas técnicas cromatográficas acoplándolas a técnicas espectrométricas con el fin de identificar dichos péptidos mediante secuenciación, pero no se ha podido demostrar la presencia de beta-7-casomorfina, llegándose a la conclusión parcial que prevalece en la literatura científica, de que no existen tales péptidos derivados de la digestión de las proteínas de la dieta en la orina de niños con autismo.

Algunos grupos de investigación han diseñado estudios para evaluar el efecto de la dieta libre de gluten y caseína en niños con TEA, observando mejoría en síntomas sociales y de la comunicación, con una reducción del comportamiento autista y reaparición de los síntomas al retirar la dieta. Respaldándose en estos estudios o en experiencias de familias que sostienen que encuentran mejoría

en los síntomas de sus hijos con autismo, muchos padres han puesto a sus hijos a dieta libre de gluten y caseína sin respaldo científico. Sin embargo, no hay evidencia consistente que demuestre siquiera la excesiva absorción de los péptidos opioides en sujetos con TEA. Se han hecho estudios para intentar demostrar la excesiva eliminación de estos péptidos, estudiando su presencia en la orina de los sujetos, con resultados aún inconcluyentes.

Ante la ausencia de demostración de la presencia de beta-7-casomorfina en las orinas y a pesar de ello, la continua demanda de alguna prueba por parte de los padres de los pacientes para poder respaldar el seguimiento de una dieta y la oferta comercial por parte de laboratorios privados de pruebas de detección de péptidos en orina, parece que la investigación en este sentido sigue estando justificada.

OBJETIVOS

Determinar la presencia de beta-7-casomorfina en orina de pacientes con TEA con técnicas modernas de identificación de péptidos. Dado que los pacientes con TEA son un grupo heterogéneo, suponemos que la hipotética absorción de la beta-7-casomorfina sería mayor en sujetos que asocien el TEA a una alteración intestinal crónica. En este trabajo se han valorado las alteraciones digestivas funcionales mediante el cuestionario Roma III-QPGS. Se han reclutado 27 pacientes con TEA y alteración digestiva funcional y 28 controles.

Se ha realizado análisis de las orinas mediante separación cromatográfica de los péptidos y análisis de la fracción que presuntamente contenía el péptido mediante espectrometría LTQ, una herramienta espectrométrica muy útil para un extenso rango de péptidos y proteínas presentes en extractos biológicos y fluidos.

RESULTADOS

Hemos conseguido detectar beta-7-casomorfina en muestras piloto de orina con una sensibilidad de 01 ng/ml, mucho mayor a la publicada en la literatura previa. La segunda fase del estudio incluyó 14 muestras (10 casos y 4 controles), siendo los resultados altamente significativos y alentadores, detectándose la beta-7-casomorfina en el 90 % de los casos (9/10) y en el 25 % de los controles (1/4). Sin embargo, en la tercera fase del estudio, al incluir la totalidad de las muestras (17 casos y 22 controles más), no se detectó beta-7-casomorfina en ninguna de ellas. En un posterior análisis de las orinas de la muestra preliminar, no conseguimos reproducir los resultados iniciales.

CONCLUSIONES

Hemos conseguido detectar beta-7-casomorfina en orinas piloto, con una

sensibilidad mucho mayor que la reportada en trabajos anteriores. Hemos conseguido detectar beta-7-casomorfina en orina de pacientes con TEA en la segunda parte del estudio, pero no hemos conseguido replicar el hallazgo en la tercera parte del estudio. En el presente trabajo se hace un análisis de las posibles causas de esta falta de reproducibilidad, posiblemente debida a limitaciones de las técnicas empleadas.

La importancia de este estudio implica la reapertura del debate sobre la hipótesis dietética de los TEA. Por otro lado, los resultados a pesar de no haber sido reproducibles, obligan a iniciar nuevas líneas de investigación con la utilización de técnicas más adecuadas para la detección de este péptido y la posibilidad de realizar intervenciones dietéticas en los pacientes de los TEA, para poder dar algo más de luz sobre la fisiopatología de esta enfermedad.

1.- INTRODUCCIÓN. ANTECEDENTES

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- DEFINICIÓN DE LOS TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA (TEA)

- *Criterios diagnósticos*
- *Evolución del Concepto*

1.2.- PREVALENCIA

1.3.- ETIOLOGÍA Y FISIOPATOGENIA

- *Factores Genéticos*
- *Interacción Genético-Ambiental*
- *Factores de Riesgo Ambiental*

1.4.- PATOLOGÍA GASTROINTESTINAL EN LOS TEA

1.5.- SISTEMA INMUNE EN LOS TEA

- *Respuesta Inmune Sistémica*
- *Respuesta Inmune en el Sistema Digestivo*

1.6.- LECHE Y PROTEÍNAS DE LA DIETA EN LOS TEA

- *Digestión y Absorción de los Péptidos derivados de la leche*
 - **Degradación de la beta-caseína**
 - **La barrera intestinal**
 - **Péptidos activos procedentes de la degradación de la leche**
 - **Dipeptidil peptidasa IV**

- *Alteraciones en la absorción de beta-7-casomorfina en los TEA*
 - **Aumento de la permeabilidad intestinal en los TEA**
 - **Alteraciones de la actividad de la dipeptidil peptidasa IV en los TEA**
- *Influencia de la Beta-7-Casomorfina sobre el Comportamiento*

1.7.- HIPÓTESIS OPIOIDE EN LOS TEA

- *Dietas libres de gluten y caseína en los TEA*
- *Inconvenientes y limitaciones de las dietas libres de gluten y caseína en los TEA*

1.8.- DETECCIÓN DE PÉPTIDOS EN ORINA

1.1.- DEFINICIÓN DE LOS TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA (TEA)

Los hoy llamados trastornos del espectro autista (TEA) comprenden un grupo de individuos caracterizado por una alteración de gravedad variable, en la función de interacción social recíproca, en la comunicación verbal y no verbal y en las actividades simbólicas e imaginativas, asociado con un repertorio escaso y repetitivo de actividades e intereses (DSM-IV TR) (Ver Anexo 1).

Estos trastornos se incluyen en las clasificaciones internacionales al uso bajo el capítulo Trastornos Generalizados del Desarrollo (TGD).

Criterios diagnósticos

Para el diagnóstico del trastorno del espectro autista y sobre todo en investigación hoy en día se utilizan fundamentalmente los criterios americanos del manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales DMS versión IV-TR. En mayo del 2013 ha salido una nueva versión del DSM, la versión DSM-5, donde se modifican parcialmente los criterios diagnósticos y se cambia el término utilizado hasta ahora de Trastorno Generalizado del Desarrollo (TGD) por el de Trastorno del Espectro Autista (TEA) (ver Anexo 1, Criterios DSM-IV-TR y DSM-5).

Evolución del concepto

Desde que Leo Kanner en Estados Unidos y Hans Asperger en Austria describieran en 1943 unos cuadros clínicos entonces llamados trastorno autista del contacto afectivo y personalidad esquizoide respectivamente y que hoy se incluyen dentro de los llamados trastornos del espectro autista, la comprensión de este concepto ha ido cambiando.

Kanner, trabajando en Nueva York, estudió 11 niños con unas características que no encajaban con los síndromes clínicos descritos hasta el momento. Se trataba de un cuadro sintomatológico de un grupo de pacientes que en una edad temprana parecían aislados socialmente o indiferentes a otras personas, resistentes a los cambios ambientales y comprometidos con actividades repetitivas. Cuando estos niños crecieron, Kanner observó una ausencia evidente de juego simbólico, fascinación por objetos que manejaban a menudo hábilmente, ausencia de interés por las personas, mutismo o habla que parecía carecer de intención comunicativa y talentos aislados o habilidades especiales que se expresaban en memoria repetitiva, cálculo y alguna otra habilidad aislada.

Hans Asperger, un médico austriaco, casi simultáneamente publicó un informe en el que describió a cuatro muchachos que, a pesar de tener habilidades verbales y cognitivas aparentemente adecuadas, demostraban problemas de interacción social y las mismas conductas que había definido Leo Kanner,

aunque en este caso se mostraban menos marcadas. El retraso mental no era importante en estos pacientes y demostraban déficits cognitivos más superficiales. Se valoró entonces como una forma de alto funcionamiento del autismo. El trabajo de Asperger se publicó en alemán y su contribución no fue reconocida hasta los años ochenta, tras la traducción de su trabajo por Lorna Wing (1).

Los criterios diagnósticos americanos de enfermedades mentales se empezaron a protocolizar con el Manual Estadístico de Enfermedades Mentales (DSM). Tanto en la primera edición de 1952, como en la segunda de 1968, el trastorno autista no se incluyó como una condición diagnóstica única, sino que los niños que presentaban un comportamiento autista fueron clasificados con los trastornos “psicóticos”, dentro de la categoría “Reacción esquizofrénica tipo infantil”. Michael Rutter en 1978 abordó la cuestión del autismo considerándolo como un síndrome y estudiando cómo éste trastorno se relacionaba con otros. Este autor consideró que el autismo se caracterizaba por su aparición antes de los 30 meses de edad, un desarrollo social alterado, retraso en el desarrollo del lenguaje y falta de flexibilidad (2). Al año siguiente, Lorna Wing y Judith Gould desarrollaron el concepto de “espectro autista”. Definieron el autismo “como un continuo más que como una categoría diagnóstica, como un conjunto de síntomas que se pueden asociar a distintos trastornos y niveles intelectuales, que en un 75% se acompaña de retraso mental y que se relaciona con otros cuadros con retraso del desarrollo no autistas, que presentan sintomatología autista”. Además, Lorna Wing desarrolló la triada de Wing (dimensiones alteradas en el continuo autista): “trastorno de

la reciprocidad social, trastorno de la comunicación verbal y no verbal y ausencia de capacidad simbólica y conducta imaginativa". Posteriormente añadió los patrones repetitivos de actividad e intereses (3).

La edición del DSM donde por primera vez se incluyó el diagnóstico de autismo fue en el DSM-III, publicada en 1980. Se incluyó dentro de un nuevo capítulo denominado "trastornos generalizados del desarrollo", donde se incluía el "autismo infantil", junto con el trastorno de Asperger y otros trastornos generalizados del desarrollo, como un trastorno profundo del desarrollo distinto de los trastornos psicóticos infantiles. Debido a la controversia que se formó alrededor del término "infantil", ya que su evolución era crónica, esta categoría vino a denominarse "trastorno autista" en 1987. En 1994 se publicó el DSM-IV, donde se incluyó bajo el capítulo general de "Trastornos Generalizados del Desarrollo" (TGD), que incluía una serie de subtipos: el trastorno autista, trastorno de Asperger, trastorno de Rett, trastorno desintegrativo infantil y trastorno generalizado del desarrollo no especificado (PDD-NOS).

La nueva versión de la clasificación americana (DSM-5), contempla el cambio de denominación de Trastorno Generalizado del Desarrollo a Trastorno del Espectro Autista. Además, se eliminan el resto de categorías diagnósticas (Síndrome de Asperger y PDD-NOS, entre otras) como entidades independientes, además de sacar explícitamente el Síndrome de Rett de los actuales TGD por su etiología genética conocida. El cambio de nombre trata de enfatizar la dimensión del trastorno en las diferentes áreas que se ven afectadas y la dificultad para establecer límites precisos entre los subgrupos.

Los criterios diagnósticos del futuro concepto de “Trastorno del Espectro Autista” cambian respecto a los actuales criterios del concepto de “Trastorno Autista”. Se fusionan las alteraciones sociales y comunicativas y se añade como obligada la presencia de alteraciones en la esfera sensorial o comportamental idiosincrásicas del autismo (ver anexo 1).

La necesidad de identificar subgrupos en los TEA, al igual que en otros trastornos neuropsiquiátricos, procede del intento de agrupar individuos con características etiológicas, pronósticas o terapéuticas comunes. Algunos autores persiguen la búsqueda de biomarcadores potenciales que apunten a mecanismos específicos de las alteraciones del neurodesarrollo, para ayudar a identificar subtipos de autismo más significativos y poder realizar tratamientos a medida o establecer estrategias de prevención para cada categoría (4). Pero ni los mecanismos fisiopatológicos de muchos de estos subgrupos son conocidos, ni lo son los biomarcadores relevantes en la mayor parte de los TEA.

1.2.- PREVALENCIA

Puesto que no están del todo claro las cifras de prevalencia de los TEA, este punto está sujeto a mucha controversia. De hecho, hay muchos estudios sobre la prevalencia de los trastornos generalizados de desarrollo que apuntan a un aumento en los últimos años.

Con el fin de determinar la evolución de la prevalencia en las alteraciones de neurodesarrollo Boyle y colaboradores (2011) estudiando diferentes poblaciones de niños americanos de entre 3 y 17 años, entre 1997 y 2008, con los datos del National Health Interview Surveys de EEUU, observaron un aumento de la prevalencia de las alteraciones de desarrollo del 12,84% al 15,04% (5).

Este aumento de prevalencia de las alteraciones de desarrollo y concretamente para el subgrupo de los trastornos autistas, fue estudiado por Liu y colaboradores (2010) en el período entre los años 1989 y 2000. Los resultados fueron de 4 casos por cada 10.000 habitantes en 1989 frente a 67 por cada 10.000 habitantes en el año 2000, con un aumento entre el 2000 y el 2005 de un 16% (6).

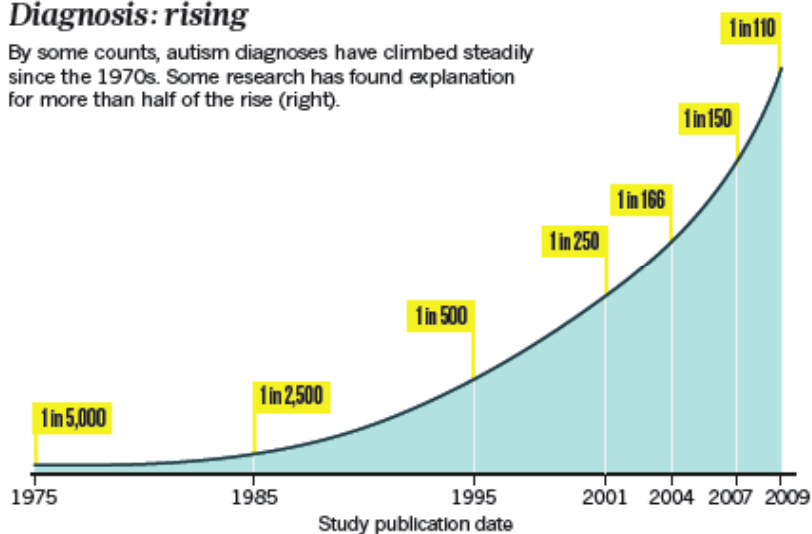
En el estudio de SNAP (Special Needs and Autism Project) de Baird y colaboradores (2006) realizado en Inglaterra, en una población de 56.946 niños con necesidades logopédicas de entre 9 y 10 años, se vio una prevalencia en

el año 2006 de 116 TEA por cada 10.000 niños (7).

Fombonne y colaboradores (2009) revisaron 43 estudios publicados desde 1966 que estimaban la prevalencia de trastornos generalizados de desarrollo (TGDs), incluyendo trastorno autista, trastorno de Asperger, trastorno de desarrollo no especificado y trastorno desintegrativo de la infancia. La conclusión fue que las estimaciones de prevalencia eran para el trastorno autista de alrededor de 20 por cada 10.000 habitantes, mientras que para el trastorno de desarrollo no especificado era de 30 por cada 10.000 habitantes y la del trastorno de Asperger era de aproximadamente 2 por cada 100.000 habitantes. Sumando los datos de todos estos estudios, los autores estimaron que todo el espectro de trastornos generalizados del desarrollo estaba en un rango del 60 al 70 por cada 10.000 habitantes, haciendo de éste uno de los trastornos de neurodesarrollo más frecuentes (8).

Diagnosis: rising

By some counts, autism diagnoses have climbed steadily since the 1970s. Some research has found explanation for more than half of the rise (right).



Tomado de "www.autismspeaks.org"

A modo de resumen, recogemos la gráfica publicada por la organización “Autism Speaks”. Como podemos ver en la gráfica, los datos del número de diagnósticos de autismo muestran que éste ha ido aumentando exponencialmente desde el año 1975 hasta el 2009.

A pesar de que parece real que la prevalencia de los TEA está aumentando, no se sabe realmente definir la intensidad del aumento ni cuáles son los factores que lo están provocando. Fombonne en su revisión postula que la extensión del concepto, la expansión de los criterios diagnósticos, el desarrollo de los servicios y la mejoría en la detección son, entre otros, factores que pueden haber contribuido al aumento de la prevalencia de este trastorno (8). Otros autores como Williams y colaboradores (2006) estiman que un 60% de las variaciones en las cifras de prevalencia pueden ser debidas a los cambios en los criterios diagnósticos, la menor edad de diagnóstico y el aumento de conocimiento y sensibilidad en determinadas localizaciones geográficas y urbanas (9). En un reciente artículo publicado en la revista “Nature” se hace referencia a un estudio de un sociólogo de la Universidad de Columbia, Peter Bearman, que ha intentado calcular la relevancia de distintos factores para explicar su aumento mediante el análisis de 5 millones de registros de nacimiento y 20.000 informes de los servicios gubernamentales de atención a problemas de desarrollo. Este autor señala que el 25% del aumento de prevalencia pudiera ser debido a los cambios en los criterios diagnósticos, el 15% al aumento de servicios especializados, el 10% al aumento en la edad de los padres y el 4% a la localización geográfica de los niños, quedando un 46% sin factores claros asociados (10).

1.3.- ETIOLOGÍA Y FISIOPATOGENIA

Los TEA son un conjunto de trastornos del neurodesarrollo donde convergen numerosos factores etiológicos que pueden afectar e intervenir entre ellos, provocando en última instancia una alteración comportamental. La etiología del autismo es multifactorial dado que varias causas pueden converger con distinta importancia en cada sujeto y donde pueden jugar un papel factores genéticos, ambientales y la interacción entre ellos. La diversidad clínica del autismo refleja la etiología heterogénea de esta enfermedad, con una gran cantidad de teorías relativas al origen de este trastorno (11). Resumimos a continuación algunas de los factores etiológicos de los TEA, haciendo especial énfasis en aquellos aspectos relevantes para el desarrollo de esta tesis.

Factores genéticos

El conocimiento de la influencia genética en el desarrollo de los TEA puede ayudar a aclarar la fisiopatología de la enfermedad, dando importantes oportunidades para el desarrollo de nuevos tratamientos y una comprensión más matizada de su evolución. Sin embargo, la heterogeneidad genética es muy importante y la información que emerge de ella muy compleja.

La literatura demuestra que el autismo no es un simple trastorno monogénico de herencia mendeliana, sino más bien un grupo de complejos síndromes genéticos con variaciones múltiples en genes múltiples. Se han encontrado gran cantidad de genes que pudieran ser responsables del desarrollo de un cuadro de TEA (12), entre los que se han señalado 103 genes y 44 locus genómicos, concluyendo que este trastorno es una manifestación comportamental de quizás cientos de alteraciones genéticas o genómicas (13).

Estudios genéticos recientes apuntan a que los genes de riesgo de los TEA están asociados a proteínas relacionadas con mecanismos sinápticos (entre ellos NRXNs, NLNGs, CNTN3/4, CNTNAP2 y SHANK3), genes asociados con alteraciones de la migración neuronal, crecimiento y diferenciación neuronal (por ejemplo, genes EN2 o MET, PTEN, TSC1/2, CTNTAP2) y también genes asociados con proteínas relacionadas con la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria (receptores de GABA y glutamato como GRIN2B) o con los canales iónicos de membrana (SCN2A). Además recientemente se han descubierto

genes que codifican proteínas relacionadas con la regulación celular (DYRK1A) o la estructura celular (KANTAL 2) o con una activación a nivel del núcleo celular (proteínas de unión al AN POGZ o modificadoras de cromatina CHD8) (14).

Aun cuando se sabe que los TEA no son trastornos mendelianos sencillos de un único gen (15), parece que pueden ser transmitidos de una manera mendeliana en algunos individuos/familias (16) (17) (18).

Hasta hace muy poco se pensaba que los SNPs (Single Nucleotide Polimorphisms), que suponen la alteración de un solo nucleótido, eran los factores genéticos que más iban a influir en la heredabilidad de los TEA.

Actualmente los estudios apuntan a que las alteraciones genéticas más relevantes son las variantes en el número de copias o CNVs (Copy Number Variants) (19). Los CNVs son una forma de variación estructural del genoma que resulta en que la célula tiene un número anormal de copias de una o más secciones del DNA, que se corresponden con regiones grandes que han sido perdidas (en número menor que el normal) o duplicadas (en número mayor que el normal). Recientes estudios han identificado regiones específicas del genoma que conllevan un riesgo importante de desarrollar TEA (20) (21), referidos anteriormente.

Se ha hipotetizado que los casos de los TEA “de novo” más numerosos y heredables se dan por un mecanismo en el que intervienen los CNVs (22) y

que el 5-8% de los casos de los TEA podrían explicarse por CNVs y concretamente en el caso de sujetos con autismo y retraso mental, se han conseguido encontrar CNVs patológicos hasta en un 22 % de los casos (23) (24).

Interacción genético-ambiental

Los CNVs, de los que hemos hablado anteriormente, son información genética particularmente vulnerable al medio ambiente. Los cambios en la regulación del ambiente de un gen, afectaran a la funcionalidad del propio gen y de las secuencias que le rodean (32).

Los TEA han sido considerados los trastornos de neurodesarrollo más heredables, con una heredabilidad de aproximadamente el 90% (25). La heredabilidad es la proporción de la variación fenotípica en una población atribuible a la variación genotípica entre individuos y estima la contribución relativa de las diferencias en factores genéticos y no genéticos o ambientales, a la varianza fenotípica total en una población. Los estudios de heredabilidad se realizan comparando el desarrollo fenotípico entre familiares con distinto grado de genoma compartido, por ejemplo en el caso de gemelos mono y dizigóticos, considerando que las diferencias entre gemelos monozigóticos son ambientales, mientras que las diferencias entre dizigóticos son genéticas y ambientales. Los estudios de gemelos en los que se basan las estimaciones de heredabilidad de los TEA informan que la relación de concordancia para gemelos monozigóticos es del 70-90% mientras que la de dizigóticos es de no más del 10% (26) (25). Esto parece indicar que los factores genéticos en muchos casos pueden no ser por sí solos los causantes del desarrollo de los TEA, sino que pueden estar relacionados con factores ambientales globales (27) o con factores ambientales maternos (28)

Aunque inicialmente se relacionó el riesgo de los TEA con factores maternos como la edad y la educación maternal (29), en estudios posteriores se ha visto que el riesgo de tener hijos con TEA aumenta significativamente con cada 10 años de mayor edad del padre y de la madre (30) y concretamente se ha señalado que la correlación con la mayor edad del padre es más marcada que la que se da con la edad de la madre (31).

Factores de riesgo ambiental

Hay evidencias relacionadas con la prevalencia, genética, exposición y patofisiología de los TEA que sugieren que los factores ambientales tienen un papel en el inicio y desarrollo de los TEA (33).

Se han estudiado diversas sustancias químicas sintéticas tóxicas que se encuentran en el ambiente que nos rodea. Concretamente en el estudio de Landrigan y colaboradores (2010) se revisaron muchas de las miles de sustancias tóxicas que hay en el ambiente y se vieron hasta 200 que presentaban actividad neurotóxica en adultos y 1000 más en modelos de laboratorio y además se comprobó que menos del 20% habían sido investigados en busca de toxicidad en el neurodesarrollo hasta el momento del estudio (34).

Ming y colaboradores (2008) observaron que había una considerable correlación entre los tóxicos ambientales y los TEA en 49 de los 50 Estados de Estados Unidos, comparando sobre un mapa los datos de los tóxicos ambientales identificados y localizados por la Agencia de Protección Medioambiental Americana en el año 2006 (The Environmental Protection Agency, EPA) (www.epa.gov/Superfund/sites/npl/npl.htm), con la población total de cada estado del último censo del 2000 (www.census.gov) y con el número de casos identificados de autismo recopilados en la base de datos IDEA del 2006 (U.S. Individuals With Disabilities Education Act) (www.IDEAdata.org).

(35).

El estudio CHARGE (Childhood Autism Risks from Genetics and Environment) intenta acotar y relacionar las causas tanto genéticas como ambientales que podrían explicar el aumento de prevalencia de este trastorno. Este es un estudio de investigación a gran escala basado en estudios epidemiológicos poblacionales enfocado a exposiciones ambientales y sus interacciones con genes como posibles causas del autismo. Estos autores inician un protocolo de reclutamiento de sujetos con TEA asociado a la Universidad de California, el Centro de Salud Ambiental para Niños (Center for Children's Environmental Health) y a laboratorios de inmunología, tomando simultáneamente medidas de agentes xenobióticos y estudiando las posibles señales celulares, junto con la genómica y la proteómica. Es un estudio de diseño caso-control, donde la muestra poblacional son niños de entre 24 y 60 meses, nacidos en la zona norte de California y residiendo en determinadas áreas designadas por el estudio (36). Este trabajo se inició en el año 2002 y hasta el momento de la primera publicación en el 2006 se habían reclutado 520 niños con TEA y sus familias. Esto permite tener a disposición de los investigadores un grupo de niños con TEA como base para el desarrollo de otros trabajos de investigación en relación con la etiología de la enfermedad y los factores genético-ambientales.

Entre las sustancias tóxicas que se han relacionado con los TEA se encuentran los polucionantes ambientales procedentes del tráfico de vehículos por carretera (37). Otros autores han estudiado los polibromodifenil éteres (PBDEs)

que contaminan alimentos, polvo y aire, de extenso uso como retardantes de llama en plásticos y espumas y de alta permanencia, pero no se ha conseguido establecer relación alguna con los TEA (38).

Con respecto a otras sustancias contaminantes químicamente más sencillas como el mercurio se ha demostrado que no tienen relación con la etiopatogenia de los TEA. Puesto que existe mucha controversia en su relación con los TEA, le prestaremos algo más de atención.

El mercurio es una sustancia contaminante ampliamente distribuida en alimentos (sobre todo en pescado), aire, pinturas, ciertos medicamentos y en la composición de las amalgamas dentales. En el caso de los TEA, Hertz-Picciotto y colaboradores (2010) midieron las concentraciones sanguíneas de mercurio total en 40 niños con TEA procedentes del estudio CHARGE y las compararon con las de 40 niños sanos de 4 años, que potencialmente habían sido sometidos a mayores exposiciones o que presentaban excreción mercurial aumentada. Aunque no se tuvo en cuenta durante el reclutamiento la dieta u otras fuentes de mercurio, sí se determinó el papel del consumo de pescado en las diferencias observadas. Los resultados mostraron que el consumo de pescado estaba relacionado en gran manera con los niveles plasmáticos de mercurio. Los niños con TEA consumían menos pescado y entre los niños tanto del grupo con autismo como del grupo control y de consumo similar de pescado, los niveles de mercurio eran similares (39).

Tampoco se ha visto que los niños con TEA tengan mayores concentraciones

urinarias de mercurio que los niños sanos (40). Por tanto, la evidencia derivada de los estudios no parece aportar relación consistente entre el mercurio consumido y la aparición de autismo.

Otra fuente potencial de mercurio son los empastes dentales de amalgamas que contienen el 50% en peso de mercurio y mercurio vapor. En el estudio de Hertz-Picciotto (2010) realizado con sujetos reclutados a partir del estudio CHARGE no se vieron diferencias en las concentraciones plasmáticas mercuriales entre niños con autismo y de desarrollo típico y sólo se relacionaron los niveles más altos de mercurio en aquellos niños con amalgamas dentales que además tenían hábitos de masticar chicle o bruxismo (39). En el estudio de Mackert y colaboradores (2010) se tomaron como población 507 niños entre 8 y 12 años que en el momento del reclutamiento tuvieran al menos una caries en una pieza permanente, pero sin tratamientos previos con amalgamas dentales. Se hizo un seguimiento de los niños que recibieron restauraciones con amalgamas en una media de 8,3 superficies dentales durante 7 años, sin observarse ningún efecto adverso neurológico en estos niños durante el estudio (41).

Por último, se ha demostrado que la exposición al etilmercurio del timerosal que contienen las vacunas y las preparaciones de inmunoglobulinas en la época prenatal y en el inicio de la vida no está relacionada con el aumento de riesgo de los TEA (42) (43) (44) (45) (46). Además de la evidencia sobre la falta de relación entre las vacunaciones y los TEA, muchos autores han resaltado la importancia médica y social que una polémica como esta puede tener sobre la

Salud Pública, habiéndose dado casos de encefalopatías víricas en niños no vacunados, prácticamente erradicadas en población vacunada.

La conexión entre vacunas y autismo ha sido un tema de gran controversia. La discusión surge a raíz de un estudio realizado por Wakefield y colaboradores (1998) donde se hipotetizó que la fracción antisarampionosa de las vacunas podría provocar una enteropatía malabsortiva que facilitaría la absorción de neuropéptidos tóxicos (47).

Dada la polémica y la importancia social que ha llegado a tener la posible conexión entre vacunas y autismo, se adjunta un Anexo al texto con la evidencia disponible y la repercusión mediática del tema (ver Anexo 2). Las investigaciones fraudulentas y de bajo nivel científico hechas por Wakefield, con claros intereses económicos y que han provocado la retracción de la revista en la que se publicó y la expulsión del primer autor del Colegio de Médicos Británico, han provocado que se haya cerrado una posible línea de investigación relacionada con el sistema digestivo en los TEA, además de provocar dudas injustificadas en la población en relación con la seguridad de las vacunaciones infantiles, con graves implicaciones sobre la Salud Pública.

1.4.- PATOLOGÍA GASTROINTESTINAL EN LOS TEA

Se sabe que el autismo es un trastorno del neurodesarrollo, con múltiples causas y mecanismos fisiopatológicos implicados, donde órganos y sistemas distintos del sistema nervioso central están involucrados y cuya afectación puede ser diferente en distintos casos.

Uno de los sistemas más frecuentemente afectado es el sistema digestivo, entre un 10 y un 70 % de los casos, siendo los síntomas gastrointestinales más comunes y manifestados por personas con TEA: estreñimiento crónico, dolor abdominal con o sin diarrea, encopresis como consecuencia del estreñimiento, reflujo gastroesofágico, gases, deficiencias en las disacaridasas, inflamación del tracto gastrointestinal y anormalidades en el sistema nervioso entérico (48) (49) (50) (51) (52) (53) (54) (55) (56) (57) (58) (59) (60) (61) (62).

Una de las manifestaciones más importantes de la patología digestiva funcional, aquella que no presenta un correlato anatómico definido, es la sensación de dolor. Los niños con TEA, dado lo restrictivo de su capacidad de expresar estados emocionales y sensaciones de bienestar o malestar y sus graves dificultades en la comunicación verbal, podrían manifestar la sensación de dolor de una manera atípica, como irritabilidad, oposicionismo, heteroagresividad, etc. (63).

En los TEA existen a menudo problemas de comportamiento recurrentes que interfieren con el funcionamiento del individuo, afectando a las familias y los

miembros de la comunidad y que son determinantes en su calidad de vida. En aproximadamente la tercera parte de los pacientes con TEA y cambios comportamentales, éstos se pueden interpretar como una afectación por situaciones de estrés o de frustración personal o familiar (64).

Se ha interpretado que algunos síntomas de irritabilidad súbita que ocurren en pacientes con TEA, manifestada como llanto inexplicado y agresividad, pudieran tener que ver con síntomas físicos como dolor (65). Incluso algunos autores han asociado las alteraciones de humor, del sueño, la irritabilidad y ansiedad con la patología gastrointestinal (51) (66) (67) (68) (69) y mantienen que el tratamiento de los síntomas gastrointestinales en niños con TEA y síntomas digestivos, podría tener efectos positivos sobre el comportamiento (69).

Entre las principales causas que se han barajado para justificar estas alteraciones gastrointestinales están las alteraciones en la flora intestinal (70) (71) (72) (73) (74) (75) (76) (77) (78) (79) (80), las alergias alimentarias (81) (82) (83) (84) (85) y alteraciones en el sistema inmune (86) (87) (88) (89) (90) (91) (92) (93) (94) (95) (96) (97) (98) (99) (100) (101) (102) (103) (104) (105) (106) (107) (108) (109) (110) (111) (112) (113) (114).

En relación a los estudios en los que se ha visto una posible alteración de la flora intestinal en los TEA (70) (71), se ha encontrado un mayor porcentaje del género "Clostridium" (72) (73) (74) (75) (76) y una mayor variedad en las especies de este género en comparación con sujetos sin TEA (73) (74).

Además se han detectado diferencias en los fenotipos metabólicos en orina de pacientes con TEA, que podrían verse influidos por los perfiles de poblaciones de la flora intestinal (77) (78) (79). Por otro lado se ha visto una mejoría de los síntomas autistas tras el tratamiento con vancomicina, un antibiótico eficaz en el tratamiento de la diarrea por “Clostridium difficile” (80).

Respecto a la posible relación con alergias alimentarias con los TEA, no se han encontrado niveles de IgE frente a alimentos que avalen esta hipótesis (115). Algunos autores han hipotetizado que las alergias alimentarias pudieran no estar mediadas por IgE (81) (82) y que pudieran tratarse de una hipersensibilidad alimentaria mediada por IgG4 (83) (84) (85). Sin embargo, ya en los 90 la Academia Americana de Alergia publicó un documento de posicionamiento al respecto explicando que no estaba claro que la IgG4 tuviera una función efectora en la respuesta alérgica (116). En esta misma línea y en el año 2008, la Academia Europea de Alergia también se posicionó sobre la idea de que la medida de los niveles séricos de IgG4 no son indicativos de alergia alimentaria ni intolerancia, manifestando que además los resultados positivos de IgG4 séricos muchas veces no van acompañados de los síntomas clínicos correspondientes y por tanto no quedaba demostrada dicha asociación (117).

Un grupo de individuos con TEA pudiera tener patología gastrointestinal asociada, que cursara con dolor entre otros síntomas. Esta patología podría estar asociada a empeoramientos en los comportamientos y síntomas propios de los TEA. Algunos autores postulan que dichas alteraciones gastrointestinales pudieran tener su origen en alteraciones en la microflora intestinal, alergias alimentarias o alteraciones en el sistema inmune.

1.5.- SISTEMA INMUNE EN LOS TEA

Respuesta inmune sistémica

Múltiples estudios evidencian una disfunción en la respuesta inmune en los TEA y aportan evidencia sobre este tema; sin embargo, resulta difícil concretar exactamente cuáles son los mecanismos afectados para que esto ocurra y no está aún claro si las alteraciones inmunológicas encontradas responden a mecanismos inespecíficos de enfermedad o por el contrario son hallazgos con una cierta especificidad respecto a la patología autista.

Se han revisado múltiples componentes del sistema inmune en los TEA. Se han estudiado tanto los niveles de poblaciones leucocitarias y su CD (Cluster Differentiation) (86) (87) (88) (89) (90) (91) (92) (93) (94), como la respuesta leucocitaria y el comportamiento frente a determinados estimulantes leucocitarios específicos (86) (95) (88) (96), los niveles de citoquinas y de otros mediadores inmunológicos de naturaleza molecular presentes en muestras sanguíneas de sujetos con TEA (97) (98) (99) (100) (101) (102) (103) (104) (105) (91) (106) (107) (108) (109) (110) (111) (112) y estos mismos niveles de citoquinas tras estimulación de las diferentes poblaciones leucocitarias con sustancias específicas (100) (113) (102) (91) (114) (96).

En general, cada estudio ha investigado un aspecto parcial del sistema inmune, con muy distintos enfoques y metodologías que hace que dichos trabajos no

sean comparables, de modo que no parece posible llegar a una conclusión que compendie todos los hallazgos que se han reportado en relación a este tema. Además, debido a las diferencias metodológicas y de planteamiento, se hace muy difícil poder comparar estos trabajos o parte de ellos para concluir algún hecho relevante común.

Sin embargo, sí podemos resumir diciendo que en general se observa una sobreestimulación de las células presentadoras de antígeno (línea monocitaria) y una situación proinflamatoria Th2, con mayores niveles de citoquinas proinflamatorias que en sujetos sin TEA, que sin embargo no se acompañan de la compensación de las citoquinas reguladoras representadas fundamentalmente por la IL10 (100) (112) (97) (106) (94) (108) (101) (118) (102) (91) (119).

La acumulación plasmática de mediadores inflamatorios va a traer consigo una situación proinflamatoria que no parece estar compensada por los mecanismos reguladores inmunes. Tanto la presencia de citoquinas reguladoras, como los procesos en los que están implicados los linfocitos T reguladores y la apoptosis celular son mecanismos que parecen estar afectados (96) (93).

Una situación proinflamatoria mantenida, sumada a la falta de factores compensadores, podría provocar una pérdida de tolerancia a los antígenos propios con consecuencias inmunológicas. Como indicador de esta situación algunos autores han encontrado autoanticuerpos a nivel sistémico que podrían contribuir a la etiopatogenia de los TEA, como anticuerpos antinucleares

(autoanticuerpos frente a antígenos intracelulares) (120) o autoanticuerpos antirribosomales P (que se encuentran en el citoplasma celular) (121).

En esa línea de investigación del sistema inmune en los TEA y debido a la naturaleza neurológica de esta enfermedad, se ha estudiado la posibilidad de que la situación inmune sistémica que se produce en los TEA tenga un reflejo a nivel del sistema nervioso.

También se ha visto en el tejido cerebral y líquido cefalorraquídeo niveles alterados de citoquinas proinflamatorias (123) (124) (125) (126) (127) y de determinados factores neuronales que juegan un papel en la apoptosis del tejido cerebral y en la regulación de la inflamación inducida por citoquinas (128) (103).

En los TEA se han visto niveles de TNF-alfa significativamente elevados en líquido cefalorraquídeo en relación a los niveles séricos, que indican una relación entre la situación proinflamatoria sistémica y la neuroinflamación (122) y elevados los niveles de neuroquinina A plasmática, un péptido proinflamatorio de tipo taquiquinina que a su vez aumenta las respuestas inflamatorias periféricas y puede ser considerado como un marcador de neuroinflamación (121).

Todo esto hace pensar que en los TEA se produce neuroinflamación (129). Este proceso neuroinflamatorio activo podría extenderse a la corteza cerebral, materia blanca y cerebelo (124) y estar asociado a procesos de generación de

autoanticuerpos frente a proteínas o estructuras cerebrales en los TEA.

Una serie de estudios han investigado en los TEA aspectos de autoinmunidad que implican a estructuras del sistema nervioso central. Mostafa y colaboradores (2011) con el fin de estudiar la posible asociación entre la neuroinflamación y la autoinmunidad en el sistema nervioso central en los TEA, midieron los niveles séricos de osteopontina, una citoquina proinflamatoria que se ha visto que juega un papel importante en varias enfermedades autoinmunes neuroinflamatorias, viendo que el 80-95% de los niños con TEA tenían niveles significativamente más altos de osteopontina que los controles sanos (110). Esta citoquina induce la producción de IL-17 por parte de los linfocitos Th17 a los que se les ha responsabilizado de tener un papel importante en los procesos de autoinmunidad.

Hay estudios en relación a la pérdida de autotolerancia que pudiera estar relacionada con la neurobiología de los TEA. Esto incluye la presencia de autoanticuerpos frente a proteínas o estructuras del tejido cerebral y frente a determinadas células específicamente cerebrales. Se ha visto presencia de anticuerpos frente a proteínas de filamento de neuroaxon (130) (131), proteína glial fibrilar ácida (anti-GFAP) (131), factor de crecimiento neuronal, factor neurotrófico derivado del cerebro (132) (133) (134) (135) y frente a mielina básica (130).

Se ha visto una cierta distribución regional de autoanticuerpos en el sistema nervioso central en los TEA con anticuerpos frente a proteínas del núcleo

caudado (136).

También se ha visto niveles de positividad antineuronal alta en los sujetos con TEA (137) relacionados con los síntomas autistas (138). Entre ellos, mayores niveles de autoanticuerpos frente a gangliósidos M1 que en controles y relacionados con la gravedad de los síntomas (139). Los gangliósidos son una familia de glicofosfolípidos expresadas en la cara más externa de la membrana plasmática de todas las células de los vertebrados, especialmente frecuentes en la membrana neuronal en el sistema nervioso y relacionados con la neurotransmisión.

Así mismo, se ha visto más frecuentemente en niños con TEA que en niños de desarrollo típico presencia de autoanticuerpos antimielina asociados a glicoproteínas (140), de autoanticuerpos frente a proteína mielina básica o MBP (141) (142) y de autoanticuerpos de isotipo IgG frente a proteína de filamento de neuroaxon y proteína acídica fibrilar glial (131).

Algunos autores han asociado alteraciones de determinados parámetros inmunes más específicamente con los comportamientos propios de los TEA, fundamentalmente relacionados con el déficit en la interacción social y la comunicación (88) (101) (143) (144) (145) (146) (147) (105) (148) (83) (120) (92) (114) (149) (150) (107) (110) (151) (152) (139) (142) (121) (138) (108). Esto sugiere una cierta relación entre la patología inmunológica observada y el proceso que lleva a la presentación de síntomas autistas.

Parece así que en los TEA puede darse una situación sistémica inmune proinflamatoria, con una posible pérdida de tolerancia hacia estructuras propias y la consecuente presencia de autoanticuerpos frente a estructuras y proteínas del sistema nervioso central, que podrían justificar algunas de las alteraciones del comportamiento propias de su fisiopatología.

Respuesta inmune en el sistema digestivo

De la misma manera que en el sistema nervioso, las alteraciones del sistema inmune en los TEA se han visto reflejadas en el tracto digestivo. Los trabajos en relación a la respuesta inmune en el tejido intestinal se han hecho tomando biopsias de distintas porciones del tracto digestivo y estudiando la expresión de los parámetros inmunes en cada uno de ellas.

Los primeros autores que asociaron los TEA a una alteración intestinal fueron Wakefield y colaboradores (1998) estudiando la asociación entre íleocolitis y regresión de desarrollo y observando una hiperplasia linfonodular ileocólica a la que llamaron “enterocolitis autista” que consideraron patológica (47). Los trabajos de este autor y su falta de ética, provocaron en la Comunidad Científica la falta de credibilidad y el abandono casi total de esta línea de investigación (ver anexo 2).

Posteriormente otros estudios han mostrado la presencia de una enterocolitis específica con infiltraciones linfocitarias en epitelio y lámina propia (153) (51) (154) (155) (156), con presencia de citoquinas leucocitarias (156) (157) (158), que sugerirían una patología inflamatoria en los TEA distinta del síndrome de Crohn, la colitis ulcerosa o la enfermedad celíaca.

Algunos autores han estudiado la posibilidad de que una parte del status inmune intestinal en los TEA pudiera tener que ver con algunos antígenos

dietéticos concretos. Los estudios en relación a la producción de citoquinas bajo estimulación con proteínas de la dieta han dado como resultado niveles elevados de citoquinas proinflamatorias intestinales (159).

En algunos estudios en TEA se han buscado anticuerpos frente a proteínas de la dieta, como caseína, lactoalbúmina y gliadina (160) (161) y se ha relacionado una menor presencia de infiltrado linfoide intestinal con las dietas libres de gluten y caseína (156) (157).

1.6.- LECHE Y PROTEÍNAS DE LA DIETA EN LOS TEA

Se ha hipotetizado que la digestión anómala de algunas proteínas de la leche y el efecto de los productos derivados de dichos productos procedentes de dichos procesos digestivos anómalos sobre el sistema nervioso central, pudiera ser una de las posibles causas de los TEA (162). Revisaremos a continuación algunos aspectos de la fisiología de la digestión de la leche en relación a las referidas hipótesis.

En general hay tres grupos de fuentes de proteínas en la leche que son: un primer grupo de proteínas llamadas caseínas (alpha s1, alpha s2, beta-caseína y kappa-caseína); un segundo grupo de proteínas, las del suero de la leche (beta-lactoglobulina, alfa-lactoalbúmina, inmunoglobulinas, glicomacropéptidos, albúmina sérica bovina) y un tercer grupo, las proteínas menores (lactoperoxidasa, lisozima y lactoferrina) (163). Las proporciones de cada grupo de proteínas en la composición de la leche van a depender de la especie de mamífero a la que nos referimos. En la leche bovina aproximadamente el 80% es caseína y el 20 % son proteínas del suero de la leche, mientras que en la leche humana el 30% es caseína y el 70% son proteínas del suero de la leche, estando las proteínas menores en muy baja proporción.

Degradación de la beta-caseína

La degradación intestinal de la beta-caseína de la leche se produce por acción de las peptidasas de las membranas de las células de cepillo, que representan un grupo de enzimas muy potentes capaces de hidrolizar un polipéptido en una mezcla de pequeños péptidos y aminoácidos.

A partir de la molécula de beta-caseína se produce la liberación de una serie de pequeños péptidos entre los que encontramos la beta-7-casomorfina, núcleo central de nuestra tesis. Jinsmaa y colaboradores (1999) estudiaron “in vitro” la liberación de la beta-7-casomorfina a partir de la beta-caseína. Se observó que la beta-7-casomorfina sólo se liberaba a partir de la variante genética de la beta-caseína A1, que contiene un residuo de histidina en la posición 67 de la cadena peptídica. Una endopeptidasa, la elastasa, parte la proteína en el enlace entre la isoleucina 66 y la histidina 67, liberándose el péptido carboxilo terminal beta-7-casomorfina, por la acción de las aminopeptidasas pepsina y leucina (exopeptidasas) (164).

La barrera intestinal

El intestino delgado tiene una función dual: por un lado, la digestión y absorción de nutrientes y por otro lado, actuar como barrera a compuestos tóxicos y macromoléculas. La función de la barrera intestinal es el control del paso de sustancias a lo largo de la mucosa y la protección del daño de sustancias sobre el lumen. Es decir, controla el paso y protege del daño.

La barrera intestinal separa el contenido luminal del intersticio, por la simple unión de las células intestinales epiteliales mediante redes de complejos proteína-proteína que unen mecánicamente cada célula a la adyacente y sellan el espacio intercelular.

Tras la digestión de proteínas, una vez que los péptidos y aminoácidos quedan liberados en el lumen intestinal, deben pasar al lado seroso. En 1975 Gardner midió el paso intestinal de aminoácidos y péptidos de la digestión de la caseína del lado luminal al seroso, mediante una preparación de intestino delgado de rata. Los resultados fueron que la relación de absorción de cada aminoácido era proporcional a su concentración, independiente de su conformación química y dependiente de si el péptido estaba libre o incluido dentro de una estructura mayor (165). Con el fin de saber si la absorción de los péptidos derivados de la caseína era distinta a la de los derivados de otras proteínas alimentarias, Gardner (1978) repitió su estudio sobre intestino de rata pero con varias proteínas alimentarias parcialmente digeridas: caseína, peptona,

proteína de soja y lactoalbúmina. El resultado de este estudio fue que los péptidos derivados del hidrolizado de soja y de caseína cruzaban la mucosa intestinal, pero no hubo evidencia del paso de otros péptidos derivados de proteínas alimentarias al lado seroso (165). En la década de los 80, Svedberg y colaboradores (1985) tomaron una serie de voluntarios jóvenes sanos y estudiaron el contenido intestinal después de haber bebido un litro de leche de vaca y observaron grandes cantidades de beta-7-casomorfina en el lado seroso del intestino (166). Posteriormente, Read y colaboradores (1990) estudiaron un trozo de intestino de cordero y observaron que tras una rápida degradación de la beta-caseína en el lumen intestinal en 10-15 minutos, la beta-7-casomorfina se absorbía a través de la pared del intestino, degradándose rápidamente, concluyendo que la semivida plasmática de la beta-7-casomorfina era de alrededor de 5 minutos en el epitelio intestinal, linfa y sangre (167).

Péptidos activos procedentes de la digestión de la leche

La leche contiene péptidos bioactivos en la secuencia de la cadena polipeptídica de la proteína madre, que se liberan tras la ingesta de los productos lácteos y como hemos explicado anteriormente, mediante la proteólisis enzimática digestiva.

Se ha visto que existe relación entre la incidencia de algunas enfermedades y el consumo de una variante genética concreta de la caseína de la leche de

vaca, la variedad genética A1. A modo de ejemplo, se ha visto que la población que consume leche que contiene niveles altos de caseína de la variante genética bovina A2, pero no de la A1, tiene menor incidencia de enfermedad cardiovascular. En el estudio de McLachlan (2001) se tomaron los datos de 17 países y se hizo un análisis de la mortalidad por infarto de miocardio basándose en los informes de la WHO MONICA (World Health Organization MONitoring in Cardiovascular Diseases) de 1995 respecto a las enfermedades cardiovasculares en edad adulta. Se estudió el consumo de leche durante un período de 5 años anterior a la muerte. Se vio una débil correlación entre infarto de miocardio y consumo de leche en todos los países. Dicha relación se hizo más importante cuando se asoció el consumo de leche de la variante genética de A1 y el infarto de miocardio (168).

Estas conclusiones fueron cuestionadas y se estableció un segundo estudio donde se incluyeron 22 países y se vio que la relación entre el consumo de leche de la variedad genética A1 y el infarto de miocardio fue muy baja para los países que tenían baja ingesta de leche, excepto para Suiza, Francia y la Isla de Guernsey, que tenían baja incidencia en infarto de miocardio, a pesar de su mayor ingesta de leche. En estos lugares en los que el consumo de leche era mayor, se vio que el consumo de la variante genética A1 era más bajo. Los países que tenían la mayor prevalencia en infarto de miocardio (Irlanda, Reino Unido, Nueva Zelanda y Finlandia) consumían mayores cantidades de la variante A1. En este estudio, el consumo de leche y la forma genética de la A1 estaba más estrechamente relacionada con el desarrollo de infarto de miocardio que el tabaco, la grasa dietética o el consumo de alcohol (169).

Algunos péptidos derivados de la digestión de la leche han demostrado tener propiedades biológicas como propiedades inmunomoduladoras, propiedades antimicrobianas, propiedades inhibidoras de la enzima convertidora de angiotensina, propiedades opioides y por último pueden unirse a minerales y funcionar como transportadores (por ejemplo, del calcio) (170).

Entre las acciones más destacables de los péptidos derivados de la leche están las digestivas, las inmunomoduladoras y las opioides, en este caso destacadas en el contexto de esta tesis por su probable repercusión en los TEA.

1.- Acción sobre el intestino. Los péptidos bioactivos procedentes de la leche parecen interactuar con receptores opioides subepiteliales del tracto intestinal (171) y tienen efecto local en la pared intestinal sin necesidad de absorción sistémica (172). La acción de estos péptidos depende de su transferencia intacta desde el lumen al lado interno, donde están localizados los receptores opioides μ y κ , con varias acciones:

a.- Inhiben la propulsión gastrointestinal (173) y la cinética de las células del colon (174) aumentando así el tiempo de tránsito orofecal (175).

b.- Los estudios en tejidos animales muestran que al añadir estos péptidos al lado seroso del intestino modifican el transporte electrolítico intestinal (176) (177).

c.- Inducen la secreción de mucina intestinal, siendo esta acción inhibida por la

naloxona (antagonista competitivo de alta afinidad por receptores opioides) (178).

2.- Actividad inmunomoduladora. Los péptidos bioactivos procedentes de la leche tienen acción inmunomoduladora a varios niveles y quizás la regulación del sistema inmune en el neonato pudiera ser su papel fundamental (179). Tanto la beta-7-casomorfina como la naloxona son capaces de unirse a la membrana de células inmunes, existiendo una estrecha relación entre su estructura y su capacidad para unirse a estas células (180). Entre otros, son capaces de unirse a receptores mu-opioides presentes en la membrana de mastocitos (181), provocando la liberación de histamina por estas células (182) y pueden estimular la fagocitosis (183) (184) (185). También se unen a los linfocitos de sangre periférica y de lámina propia humana, afectando la proliferación linfocitaria (186) (187).

3.- Actividad opioide. En estudios en tejidos, algunos péptidos procedentes de la digestión de la leche muestran actividad similar a la morfina (188). La afinidad de cada uno de estos péptidos por los receptores opioides es distinta en función de su estructura molecular. Se ha visto que la alfa-s1-casomorfina se une con alta afinidad a los subtipos del receptor kappa opioide (kappa 1 y kappa 2) mediante la secuencia Tyr-Val-Pro-Phe-Pro y que si se amida en el extremo carboxilo terminal se une a los receptores opioides delta y kappa 3 (189). Igualmente las beta-casomorfina 5, 6, 7 y 8 humanas y bovinas tienen mayor afinidad por los receptores mu-opioides, menor por los delta y aún menor por los kappa (190).

Dipeptidil peptidasa IV

Una vez que queda liberada la beta-7-casomorfina en el lumen intestinal, se degrada. Las beta-casomorfina son muy resistentes a las enzimas proteolíticas y su degradación ocurre en medio extravascular, por acción de la enzima dipeptidil-peptidasa IV (DPPIV) de las células de cepillo, dando lugar a una mezcla de Tyr-Pro, Phe-Pro-Gly, Phe-Pro y Gly. Se ha visto que la beta-7-casomorfina es uno de los sustratos naturales de la DPPIV en estudios con meconio humano como fuente de DPPIV y casomorfina de leche de búfalo (191). Además, cuando se estudia la degradación de péptidos ricos en prolina en ratas deficientes de DPPIV, se observa un aumento de la excreción de péptidos intactos en la orina de dichos animales, concluyéndose que la DPPIV es la enzima encargada de la degradación de dichos péptidos (192).

Además de encontrarse en el intestino, la DPPIV se encuentra en sangre, en concreto en la superficie de los linfocitos donde presenta una función inmune como activador antigénico y se encuentra muy relacionada con la isomorfa 1 de la adenosina deaminasa, otra enzima leucocitaria. El papel de la DPPIV en el sistema inmune es una combinación de su actividad enzimática y de su interacción con distintas moléculas.

Aumento de la permeabilidad intestinal en los TEA

Algunos autores han hipotetizado que los TEA pudieran tener aumentada la permeabilidad intestinal, de modo que péptidos pequeños, entre los que pudiera estar la beta-7-casomorfina, pudieran pasar la barrera intestinal de forma masiva.

En los estudios en los que se ha valorado la permeabilidad intestinal en los TEA se ha utilizado el test de lactulosa/manitol. Los resultados han mostrado un aumento de los niveles de lactulosa en los TEA frente a los controles (193) (50) (194) lo cual apoyaría el aumento de permeabilidad intestinal en un subgrupo de pacientes con TEA. Sin embargo, las conclusiones de los estudios difieren. Mientras que en los estudios de D'Eufemia (1996) y de De Magistris (2010) se concluye que la diferencia de valores de lactulosa entre los sujetos con TEA y los controles son indicativos de un aumento de permeabilidad intestinal, en el estudio de Robertson (2008), y basándose en los trabajos de Van Elburg (1993) (195) y de Marsilio (1998) (196) sobre la enfermedad celíaca, no se consideró que estas diferencias entre TEA y controles sanos pudieran ser determinantes, ya que según estos trabajos para que estos valores pudieran ser indicativos de una alteración en la permeabilidad intestinal, la diferencia de la relación entre controles y pacientes debería de ser

de al menos seis veces, como habría sido de esperar en patología celíaca.

De existir un aumento de la permeabilidad intestinal, ésta podría justificarse por la alteración del sistema inmune localizada en el epitelio intestinal. El sistema inmune está íntimamente relacionado con la función de la barrera intestinal y las situaciones de inflamación del intestino se asocian con el aumento de la permeabilidad de la barrera. En esta situación de inflamación intestinal con aumento de la permeabilidad de la barrera intestinal, podrían absorberse productos derivados de la dieta, que en condiciones normales no se absorberían. Esto podría estar relacionado con la respuesta inmune sistémica

Alteraciones en la actividad de la DPPIV en los TEA

En situaciones de daño intestinal, como el síndrome de malabsorción o la celiaquía, puede estar afectada la actividad intestinal de la DPPIV, con una disminución de su actividad inversamente relacionada con el daño (197). Se ha visto una disminución de la actividad sérica de esta enzima en enfermedades inmunes como la dermatitis atópica (198), en apnea (199) y enfermedades mentales como la depresión mayor y la esquizofrenia (200) (201).

En sujetos con TEA se ha visto una disminución en la expresión de DPPIV en las células monomorfonucleares (CD3 y CD26) (89) (202) y el desarrollo de anticuerpos anti-DPPI, anti-DPPIV (o CD26) y anti-aminopeptidasa N (CD13). Esta menor expresión de la DPPIV en los monomorfonucleares no parece que se de en todas las subpoblaciones de esta línea leucocitaria, ya que se ha visto aumentada la expresión de DPPIV en la subpoblación de linfocitos T CD8 (94).

Influencia de la beta-7-casomorfina sobre el comportamiento

En la situación hipotética de que un grupo de individuos con TEA presentaran un aumento de permeabilidad intestinal, los péptidos procedentes de la dieta podrían aumentar su absorción. Si además las enzimas encargadas de la degradación enzimática y eliminación del torrente sanguíneo de dichos péptidos no fueran capaces de degradarlos (por una disminución en la actividad o por una saturación enzimática), cabría preguntarse cuales serían los efectos de dichos péptidos en el organismo.

Estudios de comportamiento en animales mutados sin receptor mu- han mostrado que las sustancias opioides pueden modificar el comportamiento de apego (203) (204).

Las beta-casomorfina son ligandos de receptores mu-opioides muy potentes y específicos (188) y se ha demostrado que la administración de casomorfina causa cambios comportamentales en ratas albino recién nacidas (205) (206) (207), en sus madres (208) (209) (207) y en otros animales adultos (210) (211) (212) (213).

Se han estudiado los efectos comportamentales de la beta-casomorfina en animales y parecen reversibles con la administración de un antagonista opioide como la naloxona (214) (215) (216), lo cual podría llevar a pensar que su acción está mediada por los receptores mu- opioides.

1.7.- HIPÓTESIS OPIOIDE EN LOS TEA

Algunos autores han hipotetizado y buscado evidencia que apoya que los síntomas autistas en algunos sujetos, podrían ser el resultado de la acción sobre el organismo de péptidos opioides procedentes de la ruptura incompleta de gluten y caseína de alimentos. El aumento de la permeabilidad intestinal, también llamado “síndrome del intestino permeable”, permitiría a estos péptidos atravesar la membrana intestinal, entrar en el torrente circulatorio y cruzar la barrera hematoencefálica, afectando al sistema endógeno opioide, al desarrollo del sistema nervioso y a la propia neurotransmisión (162).

Dietas libres de gluten y caseína en los TEA

Desde las observaciones de Dohan (1984) sobre la relación existente entre la menor prevalencia de esquizofrenia en determinadas poblaciones que presentaban una dieta baja en cereales, empezó a gestarse la idea de que las dietas libres de gluten y caseína podrían mejorar los síntomas de los TEA (217).

Tras encontrar patrones cromatográficos anormales en orinas de niños con autismo, compatibles con la presencia de péptidos procedentes de la dieta (218), algunos autores establecieron la hipótesis de que la absorción de péptidos procedentes de la dieta pudiera tener implicaciones importantes en el desarrollo de estos trastornos (219).

Basándose en que el gluten y la caseína contienen en su secuencia segmentos peptídicos con actividad opioide, llamados glicimorfina y casomorfina respectivamente, se presumió que debido al aumento de permeabilidad intestinal, estos péptidos podrían ser absorbidos y alcanzar el cerebro.

El comportamiento autista podría estar parcialmente provocado por una alteración del sistema opioide cerebral, ya que estas sustancias modulan los procesos socio-emocionales que en esencia, es la afectación más importante de los TEA (220).

Algunos grupos de investigación diseñaron estudios para evaluar el efecto de la dieta libre de gluten y caseína en distintos grupos de niños con TEA. Estos investigadores reclutaron una serie de pacientes con TEA y una característica concreta como que presentaran un patrón urinario cromatográfico alterado (221), problemas gastrointestinales (222), sospecha de celiaquía (223) o simplemente diagnóstico de TEA (224) y establecieron una dieta restrictiva en gluten y caseína o bien trataron a estos niños con una dieta ordinaria y un suplemento de 20 g de gluten al día (225).

En algunos de estos estudios, tras la dieta restrictiva, se observó mejoría de los síntomas autistas y al retirarla, la reaparición de los síntomas (226) (50). En otros estudios no se han observado mejorías significativas o sencillamente evaluables (227) (228) (225). Algunos de los padres de los niños con TEA que formaron parte de estos estudios quisieron seguir con la dieta e informaron de cambios en sus niños durante el periodo en el que siguieron la dieta restrictiva (228).

Las limitaciones de todos estos estudios probablemente sean el tamaño y la heterogeneidad de la muestra, la falta de grupo control o placebo, posibles infracciones de la dieta por parte de los sujetos del estudio y la falta de una medida observacional externa o la influencia de la propia intervención en los resultados (48).

En la última década se han publicado dos revisiones sistemáticas de la Cochrane respecto al uso de dietas restrictivas de gluten y caseína en

pacientes con TEA. En el año 2004, en la revisión de Millward, sólo se encuentra un estudio que pueda ser validado con sus criterios, de modo que se hace imposible hacer un metaanálisis (229). En este estudio de escala muy pequeña, que la Cochrane termina por validar, se seleccionan 10 niños de cada grupo participante y se hacen las observaciones y test antes y después de un periodo de un año. Se comprueba que el desarrollo del grupo de niños a dieta es significativamente mejor que el del grupo control (221), los resultados de tres de los síntomas estudiados (síntomas cognitivos, habilidad lingüística y motora) muestran intervalos de confianza que apoyan esta línea de investigación, con un efecto significativamente beneficioso producido por la dieta libre de gluten y caseína de forma combinada. Sin embargo el análisis de la Cochrane concluye que la evidencia de la eficacia de estas dietas es pobre y que serían necesarios ensayos de mayor escala (229). En la segunda revisión sistemática de la Cochrane la conclusión es parecida, que los estudios disponibles son pocos y no controlados y que se necesita más investigación (230).

Sin embargo se va sugiriendo que se necesitan más estudios, que quizás estas dietas sean beneficiosas sólo para un subgrupo de sujetos y que su duración debe de ser de al menos 6 meses para que tengan un período suficiente como para poder valorar su eficacia.

Estudios posteriores más o menos rigurosos reportan resultados variables (224).

Hay muchas razones para considerar que debería de haber una justificación científica para someter a estos niños a una dieta libre de gluten y caseína (231) (232). Desde un punto de vista social supone un factor negativo añadido que puede influir en el aislamiento de estos niños (227). Desde un punto de vista nutricional, la alimentación de los niños con autismo debe ser vigilada por su particular comportamiento alimentario de una probable selectividad alimentaria (233) (234) (235) (236) y la posibilidad de incurrir en déficit nutricionales.

Algunos autores han visto grandes diferencias en los comportamientos alimentarios al comparar a los niños con TEA con los niños sanos, observándose en los TEA una mayor selectividad alimentaria (49) (60). Pero esto no está del todo claro y hay bastante discrepancia. Algunos estudios en los que no se han encontrado diferencias objetivas en la manera de comer de los niños con TEA en comparación con sujetos de desarrollo típico, ha sido la evaluación subjetiva de los padres de los niños con TEA la que ha llevado a poner en duda el comportamiento adecuado de estos niños frente a los alimentos. En estos estudios los padres no describen a sus niños como comedores sanos ni como comedores de variedad de comidas (237). Otros estudios concluyen que las diferencias en la alimentación de los niños con TEA al comparar con sujetos sanos son más marcadas en períodos anteriores a los 54 meses de edad (238).

Parece que la selectividad alimentaria que se describe en los TEA se produce según la categoría del alimento o por su textura (239), conduciendo a una dieta más restringida de lo que sería deseable, que puede llegar a limitar el consumo hasta a cinco alimentos o incluso menos (240) (236) (241).

En algunas publicaciones y artículos anecdóticos se ha tratado de analizar las causas que podían llevar a estos niños a dicha selectividad alimentaria entre las que podrían estar factores como las características organolépticas, costumbres, preferencias parentales (235) o los propios síntomas gastrointestinales (49).

Estos hábitos alimentarios no parecen provocar alteraciones en el índice de masa corporal (IMC) de estos niños entre los 3 y 7 años (242), aunque sí se ha visto que entre los 10 y 17 años hay un aumento de prevalencia de obesidad en los TEA (23,4 %) al comparar con datos de niños de desarrollo típico de la población general (12,2%) (243).

Parece que estos comportamientos relativos a la alimentación pueden provocar riesgos de deficiencia en al menos un nutriente importante (241). En los trabajos en los que se estudia la ingesta de los grupos de nutrientes en los TEA hay mucha variedad de resultados, aunque no parece haber ningún dato concluyente de que la manera de alimentarse de estos niños afecte de una manera importante a su status nutricional (244) (245) (62) (246). Concretamente en los TEA se han descrito deficiencias en los niveles de hierro (247) (248) (249), vitamina A, B6, C, ácido fólico, calcio, zinc (245), fibra, calcio,

hierro, vitamina E y vitamina D (250).

Respecto a los niños con TEA con y sin dieta libre de gluten y caseína, se han dado casos de niños que han sufrido graves deficiencias proteicas debido a la supresión de la leche (251) o más compromiso en el desarrollo óseo (247). Pero en este caso de dietas libres de gluten y caseína, parece que estos niños con TEA toman más frutas y vegetales y menos cereales, de modo que parece que la dieta es algo más equilibrada nutricionalmente y no se han visto diferencias significativas en la ingesta de energía, proteínas y micronutrientes entre los niños con TEA con y sin dieta libre de gluten y caseína (252).

Se recomienda que cualquier dieta restrictiva sea supervisadas por un dietista especializado y con un enfoque específico respecto a los comportamientos selectivos para controlar la ingesta (233) (253) (254). Hay que valorar los posibles beneficios de una dieta libre de gluten y caseína en estos niños con TEA, frente a las posibles consecuencias nutricionales que estas pueden conllevar, sin olvidar el coste personal y económico que representan estas dietas para los pacientes y sus familias (230). Pero sobretodo hay que investigar más sobre los beneficios o no de las dietas y qué grupo de sujetos en concreto podrían ser susceptibles de beneficiarse de este tipo de dietas restrictivas.

1.8.- DETECCIÓN DE PÉPTIDOS EN ORINA

Desde que en 1971 Rimland estudiara los patrones cromatográficos urinarios de 2218 niños con psicosis infantil, con el fin de determinar si podían diferenciarse las patologías mentales en función de dichos patrones cromatográficos urinarios (255), numerosos autores han estudiado las orinas de pacientes con enfermedades mentales en busca de marcadores moleculares y más concretamente proteicos, que ayudaran al conocimiento de dichas enfermedades. Los resultados del estudio de Rimland no fueron concluyentes pero abrieron una línea de investigación que aún no se ha cerrado.

Se han estudiado los patrones urinarios cromatográficos de pacientes con distintas enfermedades mentales, con el objetivo de dilucidar si éstos podían ser de ayuda al diagnóstico diferencial de estos pacientes. Algunos autores han encontrado patrones alterados o picos cromatográficos diferentes de los encontrados en controles (218) (256) (257) (258) (259), aunque no todos los trabajos han podido replicar los resultados (260).

Estos autores postulaban que el exceso de neuropéptidos era debido a la “sobreproducción” de péptidos en el sistema nervioso central. Ésta sobreproducción podría conducir al “hiperfuncionamiento” de algunos sistemas neuronales, provocando un exceso de péptidos que se eliminaría por la orina (256) y se detectarían por técnicas cromatográficas. Los picos cromatográficos

alterados podían explicarse así por un problema metabólico específico, relacionado con las proteínas o su transporte orgánico (218) (256) (257) (258) (259).

Se estudiaron también los patrones cromatográficos urinarios en pacientes con y sin tratamiento con el fin de comparar y evaluar dichos patrones (261) (262).

Basándose en los trabajos de Dohan de la relación entre el consumo de gluten y una predisposición genética a desarrollar esquizofrenia (263) y en los descubrimientos anteriores de la existencia de péptidos activos derivados de la digestión del gluten (264) y de proteínas de la leche (265) (266), un grupo de autores noruego propone que la peptiduria que se había encontrado en los estudios precedentes podría ser explicada por la hipótesis de Dohan de que la esquizofrenia podía ser debida a una ruptura enzimática intestinal incompleta de dichas proteínas de la dieta (267), que pudiera provocar la liberación de dichos péptidos en el organismo (268).

Dos estudios han encontrado picos peptídicos en las orinas de celíacos, un grupo de pacientes susceptible de presentar daño en el intestino delgado, y se ha relacionado dicho patrón de péptidos con la dieta, resultando que éste patrón peptídico urinario disminuía al instaurar la dieta libre de gluten (269) (270), de modo que concluyeron que la peptiduria podría ser debida a la degradación de las proteínas procedentes de la dieta.

Se intentó entonces relacionar enfermedades mentales como el Síndrome de

Down con los patrones cromatográficos urinarios y con anticuerpos frente a proteínas procedentes de la dieta como gliadina, gluten, alfa-lactoalbúmina, beta-lactoglobulina, caseína y ovoalbúmina, pero no se obtuvieron resultados (271).

Respecto a la patología autista, se ha intentado estudiar la utilidad de los patrones peptídicos urinarios como marcador de la patología o de la gravedad o afectación de la enfermedad (272) (273) (274) (275).

El grupo de investigación noruego estudió los patrones cromatográficos de las orinas de pacientes con TEA y con síntomas gastrointestinales asociados, con el fin de relacionarlos con la dieta libre de cereales y leche, interpretando que los patrones cromatográficos encontrados revelaban la presencia de compuestos aromáticos de origen endógeno causadas por alteraciones relacionadas con la alimentación (276).

En posteriores estudios de este grupo de investigadores, los patrones cromatográficos urinarios se tomaron como base para establecer un tratamiento dietético que excluyera el gluten y la caseína de la dieta como probables precursores de estos péptidos urinarios (269) (277), observando mayores cambios comportamentales en los niños que estaban a dieta libre de gluten y caseína (221) (224). Sin embargo y a pesar de los resultados, en estos estudios no se tuvieron en cuenta factores como los efectos de la propia intervención que podía tener la instauración de la dieta sobre el comportamiento, no la dieta en sí, y no se establecieron controles, de modo

que se necesitan más estudios para determinar el potencial de la intervención.

Hasta la década de los años 2000 se había aplicado para la determinación de la peptiduria una técnica cromatográfica en la que se utilizaba columna de Sephadex 25 o columna C18 en fase reversa y las eluciones se sometían a detectores de luz UV a 215 nm y a 280 nm. Aun cuando estos estudios arrojaban datos sobre la posibilidad de que estos niños con TEA presentaran peptiduria, estas técnicas no permitían la identificación de los compuestos responsables de los picos cromatográficos. Dichas técnicas se limitan al análisis de la presencia de sustancias de determinadas características moleculares que resultan en un comportamiento físico-químico dado, con una determinada elución cromatográfica (momento de salida de la columna cromatográfica) asociada a una determinada capacidad de absorción de luz UV a determinadas longitudes de onda. Estos estudios solo pueden concluir que hay un patrón cromatográfico “*compatible*” con la presencia de una determinada sustancia.

A partir de aquí, estudios posteriores han intentado identificar los compuestos responsables de dicha peptiduria en los TEA mediante la asociación a las técnicas cromatográficas de técnicas espectrométricas LC-MS/MS (Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometric) (89) (278) y MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight Mass Spectrometry) (279), con el fin de identificar péptidos concretos procedentes de la dieta como casomorfina y glicimorfina, derivados de la digestión de la caseína y del gluten respectivamente. Estos estudios no han conseguido identificar dichos péptidos

de las eluciones cromatográficas de las orinas (89) (278) (279).

De entre éstos estudios citados, únicamente en el trabajo de Dettmer se consiguió recuperar la beta-7-casomorfina de una solución acuosa patrón contaminada con beta-7-casomorfina comercial con una sensibilidad de 0,25 ng/ml y tanto en el estudio de Dettmer como en el de Cass se recuperó la beta-7-casomorfina en orinas patrones (contaminadas con beta-7-casomorfina estándar) en una concentración de 250 ng/ml y de 0,75 microg/ml (750 ng/ml) respectivamente (278) (279).

Estos autores llegan a la conclusión de que, de estar estos péptidos en las orinas de los niños con TEA, se encontrarían en concentraciones inferiores a la sensibilidad definida (278) o de forma categórica que estos péptidos no se encuentran en las orinas de niños con TEA (279). En ambos estudios no se tuvo en cuenta la patología gastrointestinal de los sujetos, ni diferencias clínicas importantes como el nivel de discapacidad.

Un estudio ha utilizado estas técnicas espectrométricas (LC/MS/MS) con orinas de pacientes con depresión, aunque en este trabajo no se hizo fragmentación de los picos espectrométricos, sino que los resultados obtenidos fueron comparados con los derivados de contaminar las orinas con glicimorfina y casomorfina estándar, de modo que, aunque encontraron una compatibilidad de masas moleculares con respecto a los péptidos estándar, tampoco llegaron a realizar una identificación completa de dichos péptidos mediante fragmentación y secuenciación por las técnicas espectrométricas (262).

En aras de demostrar que péptidos derivados de la dieta y con actividad opioide podrían atravesar la barrera intestinal de los pacientes con TEA, algunos autores han buscado dichas sustancias en las orinas de estos pacientes.

De forma clásica se usaban técnicas cromatográficas para la búsqueda de sustancias en orinas. Dichas técnicas separan los compuestos y los someten a radiación UV de determinadas longitudes de onda, que dichas sustancias absorben en función de sus características moleculares. De esta forma, sustancias que arrojan picos en las mismas zonas de las curvas cromatográficas y que absorben la luz de la misma manera, presentan compatibilidades moleculares y se consideraban de estructuras sinónimas.

Hasta que no se aplicaron las técnicas espectrométricas no ha habido posibilidad de identificar realmente las sustancias procedentes de las orinas, mediante fragmentación y secuenciación concretamente de cada una de las sustancias.

En este sentido, mientras mediante las técnicas cromatográficas los investigadores aseguraban la presencia de los péptidos derivados de la digestión de las proteínas de la dieta en las orinas de los pacientes con TEA, los intentos de identificarlos mediante técnicas espectrométricas han sido infructuosos.

Los datos hasta aquí revisados muestran una hipótesis prometedora respecto a una posible vía fisiopatológica del autismo. Péptidos derivados de la dieta serían incorrectamente absorbidos por el organismo debido a un aumento de permeabilidad intestinal (por razones genéticas, ambientales o la interacción de ambas). Estos péptidos generarían (o se acompañarían de) un estado inflamatorio e inmunitario anómalo y podrían atravesar la barrera hematoencefálica, con actividad sobre receptores opioides endógenos pudiendo afectar en momentos sensibles al desarrollo y a la maduración cerebral y produciendo alteraciones comportamentales.

Pretendemos con este trabajo aportar evidencia sobre uno de estos elementos: la inadecuada presencia de beta-7-casomorfina en orina de sujetos con TEA. Los resultados previos a este respecto son contradictorios, un solo grupo de investigación (el grupo de Knivsberg y Reichelt) que, por cromatografía, mostraban la presencia de unos péptidos compatibles con péptidos derivados de la dieta y dos artículos recientes (278) (279) que, por espectrometría, se ha fracasado en el intento de identificar dichas señales espectrométricas como correspondientes a estos péptidos.

Creemos que la conclusión parcial que aparece en la literatura es la inexistencia de estos péptidos en la orina de sujetos con TEA es precipitada y alcanzada sin suficiente evidencia y nos proponemos revisarla, aplicando técnicas proteómicas modernas.

2.- OBJETIVOS

- a. Poner a punto una metodología proteómica de detección e identificación de péptidos (cromatografía acoplada a espectrometría) para la determinación de beta-7-casomorfina en orina en concentraciones inferiores a las ya reportadas de 250 ng/ml.
- b. Reclutar una muestra de pacientes con TEA y alteraciones digestivas funcionales y un grupo control pareado por edad y sexo, sin patología psiquiátrica ni patología digestiva funcional.
- c. Evaluar la presencia de beta-7-casomorfina en orina de pacientes con TEA que presenten patología digestiva funcional asociada y compararla con sujetos control sin autismo ni patología digestiva asociada.

3.- HIPÓTESIS

1. Se puede detectar e identificar la presencia de péptidos derivados de la dieta en orina, mediante técnicas cromatográficas en tándem con técnicas espectrométricas (técnicas proteómicas) en una concentración menor que 250 ng/ml.
2. Se detectará la presencia de beta-7-casomorfina en orina en un grupo de pacientes con trastorno del espectro autista (TEA) y con patología digestiva funcional asociada, con mayor frecuencia que un grupo de controles sanos.

4.- MATERIAL Y MÉTODO

4.- MATERIAL Y MÉTODO

4.1.- DISEÑO DEL ESTUDIO

4.2.- PARTICIPANTES

4.3.- EVALUACIÓN CLÍNICA

- *Criterios DSM-IV-TR*
- *ADOS-R*
- *Cuestionario ROMA-III-QPGS de patología digestiva funcional*
- *Muestra del estudio*

4.4.- EVALUACIÓN BIOQUÍMICA

- *Material*
- *Método*
 - **Puesta a punto de la técnica**

4.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.6.- ASPECTOS ÉTICOS

4.1.- DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio trasversal de casos-controles para la determinación de la presencia de beta-7-casomorfina en orina de sujetos con autismo y patología digestiva funcional y controles sanos pareados por edad y género.

El análisis se planificó en dos fases: una fase preliminar coincidente con el periodo de finalización de la beca que sustentaba el proyecto y una fase final con el total de muestra recogida.

Las fases del proyecto han sido:

1. Reclutamiento de 30 pacientes con trastorno del espectro autista (TEA) y con patología digestiva asociada.
2. Obtención de consentimiento informado de los pacientes y de sus padres y/o tutores legales para su participación en el estudio y valoración de los criterios de inclusión y exclusión de los pacientes.
3. Reclutamiento de 30 controles sanos, pareados con pacientes por sexo y edad.
4. Obtención de consentimiento informado de los controles sanos y de sus padres y/o tutores legales para su participación en el estudio y

valoración de los criterios de inclusión y exclusión de los controles sanos.

5. Entrevista clínica y recogida de datos sociodemográficos de los pacientes y sus padres o tutores. Obtención de la primera de orina de la mañana de los pacientes.
6. Entrevista clínica y recogida de datos sociodemográficos de los controles sanos y sus padres o tutores. Obtención de la primera muestra de orina de la mañana de los controles sanos.
7. Almacenaje de las muestras de orina en cámaras frigoríficas (-80° C) del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.
8. Puesta a punto de la técnica de laboratorio de proteómica para la detección de péptidos: 1) primero en solución acuosa contaminada con beta-7-casomorfina comercial y 2) en orinas patrón, con diluciones progresivas de beta-7-casomorfina comercial hasta encontrar la sensibilidad de la técnica (concentración mínima a la que se detecta la beta-7-casomorfina)
9. Traslado de las muestras de orina al Laboratorio de Proteómica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid para su posterior análisis proteómico.

10. Análisis de las orinas por técnicas cromatográficas y espectrométricas.
11. Construcción de una base de datos y análisis estadístico de los resultados. Comparación entre pacientes con TEA con patología intestinal asociada y controles sanos.

4.2.- PARTICIPANTES

Se evaluaron 32 pacientes y 30 controles para el cumplimiento de los criterios de inclusión y exclusión.

Pacientes

Se ofreció el estudio a todos aquellos pacientes que, tras divulgación en Asociaciones de Familiares, contactaron o se vieron en consulta, con posible diagnóstico de TEA y alteraciones digestivas funcionales.

Se evaluaron 32 pacientes para el cumplimiento de los criterios de inclusión y exclusión.

I. Criterios de inclusión de pacientes:

- a. Edad entre 3 y 17 años.
- b. Diagnóstico de trastorno del espectro autista (TEA) según criterios DSM-IV-TR.
- c. Presencia de patología digestiva funcional, valorada mediante el Roma III-QPGS (www.romecriteria.org) (The Questionnaire on Pediatric Gastrointestinal Symptoms, QPGS).
- d. Presencia en la dieta habitual del paciente de caseína o leche y derivados lácteos.
- e. Autorización de los pacientes y de sus padres y/o tutores legales para su participación en el estudio mediante consentimiento informado por escrito.

II. Criterios de exclusión de pacientes:

- a. Presencia de otros diagnósticos psiquiátricos diferentes a los TEA, según criterios DSM-IV-TR.
- b. Presencia de etiología conocida que pudiera provocar el cuadro de TEA.
- c. Seguimiento de dieta libre de caseína o leche y derivados lácteos.

Controles

Del mismo modo, se ofreció el estudio a aquellos posibles controles que contactaron con el equipo investigador mediante difusión del estudio entre conocidos de los propios pacientes y otros contactos, incluyendo anuncios en los lugares de trabajo de los investigadores. Se evitó reclutar familiares de pacientes y controles de muestras clínicas de otras patologías, por lo que se contactaron niños y pacientes de la población general.

I. Criterios de inclusión de controles sanos:

- a. Edad entre 3 y 17 años.
- b. Presencia en la dieta habitual de caseína o leche de vaca y derivados lácteos.
- c. Autorización de los controles (mayores de 12 años) y de sus padres y/o tutores legales para su participación en el estudio mediante consentimiento informado por escrito.

II. Criterios de exclusión de controles sanos:

- a. Presencia de cualquier diagnóstico psiquiátrico, según criterios DSM-IV-TR, tras administración de la entrevista semiestructurada K-SADS-PL (280).
- b. Presencia de patología digestiva valorada mediante el cuestionario Roma III-QPGS.
- c. Seguimiento de dieta libre de caseína o leche y derivados lácteos.

4.3.- EVALUACIÓN CLÍNICA

La evaluación clínica se realizó por dos psiquiatras con más de 5 años de experiencia del Servicio de Psiquiatría de Niños y Adolescentes del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

Se evaluó la patología psiquiátrica en los casos, mediante el estudio de la historia clínica de los pacientes, estudio de todos los informes médicos, educativos y sociales disponibles y la aplicación de los criterios diagnósticos DSM-IV-TR. El cumplimiento de criterios DSM-IV-TR se expuso en reuniones de consenso diagnóstico y en aquellos casos dudosos se realizó entrevista observacional ADOS-R (Autism Diagnostic Observation Schedule-Revised).

En los controles se aplicó la entrevista semiestructurada KSADS-PL.

Todos los casos y los controles respondieron al cuestionario Roma III-QPGS.

Criterios DSM-IV-TR

Se adjuntan en Anexo 1 los criterios DSM-IV-TR para Trastorno del Espectro Autista.

ADOS-R.

Entrevista observacional Autism Diagnostic Observation Schedule-Revised

En los casos en los que hubo dudas en el diagnóstico tras el consenso entre psiquiatras, se administró la entrevista diagnóstica ADOS-R (281). Esto se realizó al 20 % de los pacientes.

La entrevista ADOS-R está considerada el gold estándar de la observación para apoyar el diagnóstico de autismo. Se trata de una entrevista semiestructurada que contiene una serie de tareas diseñadas especialmente para provocar la interacción social entre el entrevistado y el entrevistador y así poder evaluar sus capacidades relacionales y comunicativas. Además, permite la evaluación del lenguaje, tanto verbal como no verbal y los intereses y el comportamiento del niño. Hay 4 módulos y se aplica uno solo, que se elige en función de la edad y el nivel de lenguaje del niño con autismo. La entrevista tiene una duración aproximada de 45 minutos a 1 hora, se puede grabar y se sigue una puntuación estandarizada que clasifica los resultados como pertenecientes a tres posibles categorías: “Autismo”, “Trastorno del Espectro Autista” o “No Trastorno del Espectro Autista”. La entrevista ADOS tiene unas buenas propiedades psicométricas y se ha convertido en la entrevista más extendida para ayudar al diagnóstico de autismo.

En el Anexo 5 se puede ver, a modo de ejemplo, el Módulo 3 del ADOS.

Kiddie Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for school-age children-Present and Lifetime version

El K-SADS-PL (280) se utilizó para descartar patología psiquiátrica en los controles. Todos los sujetos fueron evaluados por psiquiatras entrenados para ello mediante la versión española de la K-SADS-PL realizada por Dra. Mónica Wolff y colaboradores y cedida al Dr. Cesar Soutullo en septiembre de 1999 para su adaptación al español de España. Esta es una entrevista semiestructurada diseñada para obtener puntuaciones de gravedad en múltiples síntomas y valorar la psicopatología presente y pasada. Se compone de una parte inicial donde se recoge la historia clínica general; después vienen desarrollados una serie de capítulos dedicados a recoger sintomatología específica de “screening” de varios trastornos; depresivos, psicosis, trastornos de pánico, trastorno de ansiedad por separación, trastorno evitativo/fobia social/agorafobia y fobias específicas, trastorno de ansiedad generalizado, trastorno obsesivo compulsivo, enuresis, encopresis, anorexia nerviosa, bulimia nerviosa, trastorno por déficit de atención e hiperactividad, trastorno oposicionista desafiante, trastorno de conducta y trastorno por tics. Dentro de cada grupo se incluyen ítems que hacen referencia a síntomas específicos. Cada ítem se puntúa como 0 (sin información), 1 (ausente), 2 (subumbral, si el síntoma aparece de forma ocasional) y 3 (umbral). Existen suplementos más

detallados que sólo se rellenan si se alcanza una puntuación umbral en algún ítem. También trata de obtener información acerca del consumo de tabaco, alcohol y otras sustancias, así como abuso de dichas sustancias y trastorno de estrés post-traumático. Los resultados se recogen en una ficha final una vez corregidos, en la que se da una puntuación final de 1 (ausente), 2 (probable), 3 (remisión parcial) y 4 (definitivo) para cada trastorno. De la entrevista se derivan diagnósticos DSM-IV.

Cuestionario ROMA-III-QPGS de patología digestiva funcional

El cuestionario ROMA (www.romecriteria.org) está desarrollado para poder clasificar aquellos problemas digestivos en que los síntomas y los signos clínicos no tienen un correlato anatómico bien definido. Estos cuestionarios pretenden realizar una definición diagnóstica y formular criterios diagnósticos estrictos para lograr un diagnóstico positivo y no por descarte de una enfermedad funcional sin incluir cuadros orgánicos, con el menor número de exámenes auxiliares complementarios. Este cuestionario representa un espectro de varios grupos de patología, con 20 cuadros clínicos diferentes en adultos. Separa la patología pediátrica en neonatos y lactantes en un grupo y niños y adolescentes en un segundo grupo. En este cuestionario se consideran los síntomas digestivos de 6 meses de antigüedad para diagnosticar una patología digestiva funcional.

En nuestro caso elegimos el cuestionario de síntomas gastrointestinales pediátricos (The Questionnaire on Pediatric Gastrointestinal Symptoms, QPGS), diseñado sobre los informes de los padres de los niños pacientes y controles y de los propios niños controles, basándose en el criterio pediátrico Roma III.

Traducimos al español este cuestionario, considerando su validez basándonos en que en todo momento fue aplicado por clínicos y por tanto, no consideramos necesario las exigencias de un cuestionario autoaplicado.

En segundo lugar para respaldar la validez de este cuestionario, se tuvo en cuenta el trabajo de Caplan y colaboradores (2005) que estudiaron el cuestionario QPGS, diseñado sobre los informes de los padres y de los propios niños basándose en la entrevista pediátrica Roma II. En dicho trabajo participaron 35 pacientes de entre 4 y 18 años y sus padres. Los pacientes presentaban una clínica gastroenteral clasificada como problema funcional. Los análisis de lo que los padres y los niños informaban indicaba que todos los puntos del cuestionario eran pertinentes y de distribución variable. El 60% de los padres de los niños de entre 10 y 18 años no era capaz de responder a preguntas sobre la defecación y síntomas subjetivos, pero los niños mayores de 10 años completaban sin dificultad el cuestionario. Los padres respondían mucho mejor a fenómenos observables, como vómitos y palidez, que a experiencias subjetivas como intensidad de dolor, sensación de calor y asociaciones entre dolor y comidas (282). Este estudio confirmó la validez de este cuestionario para clasificar las alteraciones digestivas funcionales en niños de entre 4 y 9 años, en los que los padres respondieron sin ninguna duda. Para niños mayores de 9 años, parece que los padres empezaban a no estar tan seguros de respuestas como el aspecto de las heces de sus hijos o el número de veces que los niños habían acudido al cuarto de baño, aunque los niños eran ya capaces de responder al cuestionario por sí mismos.

En el caso que nos ocupa la duda se presenta en la valoración de pacientes que por su patología no tienen lenguaje o no son capaces de expresar los síntomas digestivos. El grupo de estos niños que se encuentran entre 9 y 17 años presentan unas características comportamentales que conlleva la

monitorización continua por parte de los padres y cuidadores, por lo que creímos pertinente utilizar la versión pediátrica con entrevista a padres. Sin embargo, no podemos obviar otras características de estos sujetos que dificultan la valoración de los síntomas funcionales digestivos recogidos en el cuestionario, como es la incapacidad de comunicar el dolor u otros síntomas.

En el Anexo 6 se adjunta una copia del cuestionario ROMA-III QPGS. Los resultados de este cuestionario clasifican la patología digestiva funcional en 10 grupos:

- I. Dispepsia funcional.
- II. Síndrome de colon irritable.
- III. Migraña abdominal.
- IV. Dolor abdominal funcional.
- V. Síndrome de dolor abdominal funcional.
- VI. Estreñimiento funcional.
- VII. Incontinencia fecal no retentiva.
- VIII. Aerofagia.
- IX. Síndrome rumiante del adolescente.
- X. Síndrome de vómitos cíclicos.

Muestra del estudio

Se realizaron evaluaciones a 32 pacientes y 29 controles.

Respecto a los pacientes, tras realizar entrevistas de consenso diagnóstico para todos, se excluyeron 5 sujetos por las siguientes razones: 1 estaba con dieta libre de gluten/caseína, 1 caso no cumplía criterios diagnósticos claros para TEA después de la evaluación clínica completa y 3 casos no cumplían criterios de trastorno digestivo funcional según el cuestionario ROMA

Respecto a los controles, 1 presentaba comorbilidad con trastorno de ansiedad según criterios DSM-IV-TR y 2 cumplían criterios ROMA para algún trastorno digestivo funcional.

Por tanto, la muestra final se compuso de 27 sujetos con TEA y alteración digestiva funcional y 26 controles.

4.4.- EVALUACIÓN BIOQUÍMICA

Material

Para realizar las técnicas cromatográficas acopladas a las técnicas espectrométricas necesitamos:

- Sistema de nano-cromatografía líquida capilar con elución peptídica monitorizado por detector de rayos ultravioleta y acoplado a un colector de micro fracciones (Probot) de LC-Packings.
- Espectrómetro de masas 4700 Proteomics Analyzer con TOF/TOFTM, con fuente de ionización tipo MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) y dos analizadores tipo tiempo de vuelo (TOF, Time Of Flight) en tandem y cámara de colisión (CID) para fragmentación de iones de Applied Biosystems.
- Espectrómetro de masas de tipo trampa iónica lineal LTQ (Linear Trap Quadrupole) (Thermo Finnigan).
- Muestra de beta-7-casomorfina (Laboratorio Anaspec, ref 61124).
- Base de datos de Swissprot con motor de búsqueda MASCOT. Swissprot es una Base de Datos de proteómica predefinida, que se gestiona con el

programa Mascot y que tiene información actualizada de las secuencias de proteínas más conocidas. Mascot es un motor de búsqueda que utiliza datos de espectrometría de masas para identificar proteínas en Bases de Datos (<http://www.matrixscience.com>).

- Laboratorio de Proteómica

Todas las determinaciones analíticas relativas a la identificación de la beta-7-casomorfina se han realizado en el Laboratorio del Centro de Proteómica del Parque Científico de la Universidad Complutense de Madrid. Este laboratorio pone a disposición de los investigadores y de las empresas que lo requieran un conjunto de servicios de apoyo a la investigación en el campo de la Proteómica y está dotado de tecnologías, equipamientos y personal técnico altamente cualificado. Cuenta con una amplia experiencia en el análisis, identificación y caracterización de proteínas. Actualmente el centro da servicio a más de 100 grupos de investigación, siendo esencial para un elevado número de proyectos de investigación en diferentes áreas de la biomedicina y la bioquímica, que pertenecen tanto a centros públicos como privados, nacionales y extranjeros. La Unidad de Proteómica está integrada en la Red Nacional de Proteómica (ProteoRed).

Método

Puesta a punto de la técnica

1.- Determinación de beta-7-casomorfina en solución acuosa

- En el desarrollo de la técnica, la primera aproximación fue la puesta a punto de las técnicas proteómicas para identificar el péptido beta-7-casomorfina, a partir de un estándar comercial, beta-7-casomorfina bovina (Cat-#61124 AnnaSpec, Inc 1 mg) en solución acuosa.
- Preparamos diluciones acuosas con la beta-7-casomorfina comercial en distintas concentraciones decrecientes para comprobar de una manera previa la validez de la técnica, sin interferencias de otras sustancias presentes en la orina y determinar la concentración mínima de beta-7-casomorfina que nos permitía detectar la técnica espectrométrica y por tanto su sensibilidad.
- En esta primera fase de preparación de la técnica usamos para la identificación del péptido un espectrómetro de masas tipo MALDI-TOF/TOF. Posteriormente, procedimos a la identificación del péptido específico mediante fragmentación, obteniendo la secuencia del péptido primero mediante interpretación manual del espectro MS/MS y búsqueda en la base de datos de Swissprot con motor de búsqueda MASCOT.

2.- Análisis de orinas patrón contaminadas con estándar

La segunda estrategia consistió en añadir cantidades decrecientes del péptido estándar a orinas patrones de sujetos sanos, con el objetivo de determinar la presencia del péptido beta-7-casomorfina en una muestra de orina con todas las características propias de este material orgánico. Para esto se siguieron diferentes pasos.

- Recogida de dos orinas piloto.
- Contaminación de la muestra con cantidades decrecientes del péptido estándar beta-7-casomorfina.
- Centrifugación de la orina para extraer los péptidos del sobrenadante, eliminando restos sólidos y sustancias de alto peso molecular. Se tomaron alícuotas de 2 ml, congelando el resto que no íbamos a utilizar.
- Estas alícuotas de 2 ml se sometieron a filtración. Se utilizaron filtros de 0,22 micras para eliminar bacterias y otros materiales mayores que el tamaño del poro y que no habían sido separados mediante la centrifugación inicial.
- Posteriormente se realizó desalado de la muestra para eliminar pigmentos y sales biliares por cromatografía en precolumna de fase reversa C18 (PepMap™ C18 μ -precolumna, 300 μ m i.d. \times 1 mm, Dionex), con resina

tipo poros R2[®], empaquetada manualmente. Este desalado se realizó simultáneamente a una separación según las características de hidrofilia de los péptidos. La beta-7-casomorfina es más hidrófilo por ser más pequeño y por tanto, sale al principio de la elución. Los péptidos fueron eluidos con un gradiente de acetonitrilo (ACN) al 95% en ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% a un flujo de 20 microlitros/min, de 60 minutos.

- De esta manera se obtuvieron 200 microlitros de elución, que concentramos hasta 10 microlitros, que es la cantidad que carga el espectrómetro. Esta concentración la conseguimos mediante Speed-vac, una centrifuga al vacío que evapora todo lo volátil, como agua o acetonitrilo.

- Se hizo la separación previa de los péptidos presentes en la orina, mediante nano-cromatografía líquida capilar de alta resolución (LC Packing). Se utilizó una columna analítica C18 de fase reversa BioBasic C-18 PicoFrit. Se aplicó una velocidad de flujo de 200 nl/minuto, utilizando agua y acetonitrilo al 0,1% de ácido fórmico como disolventes A (fase móvil) y B (fase de elución) respectivamente. El gradiente empezó y se mantuvo durante 5 minutos al 5% de B, después del 5-70% de B durante 45 minutos y por último 90% de B durante otros 5 minutos.

- A la salida de esta columna se monitorizó con un detector de rayos ultravioleta, a cuya salida hay un colector de microfracciones (Probot), que deposita los péptidos separados directamente y de forma totalmente automática sobre las placas del espectrómetro LTQ con fuente de ionización

nanoelectrospray, a la que estaba acoplada la columna cromatográfica, que vamos a describir a continuación. Esta columna estaba acoplada al espectrómetro de masas tipo LTQ, por lo que los péptidos según van eluyendo se van analizando on-line. Esta técnica nos permite detectar aquellos péptidos compatibles por su masa molecular con la beta-7-casomorfina. La fuente de ionización es nanoelectrospray y los parámetros de adquisición utilizados fueron dependientes de los datos y fueron los siguientes: Full-scan MS (400-1800 m/z), seguido de un Zoom de los 10 picos más intensos y su fragmentación por MS2 con una energía de colisión normalizada del 35 %. Este tipo de espectrometría se optimiza habitualmente para procesar aquellos picos más intensos de 1000. Utilizamos una lista de inclusión con los iones de interés y una lista de exclusión dinámica de 20 segundos.

- Posteriormente, se produciría la identificación de los péptidos específicos mediante fragmentación, obteniendo la secuencia de los péptidos mediante interpretación manual del espectro MS/MS. Se realizó la búsqueda en la base de datos de Swissprot, con motor de búsqueda MASCOT. Entre los espectros MS2 obtenidos se buscó el espectro del precursor de m/z 790.3 correspondiente al péptido beta-7-casomorfina bovina. Se secuenció manualmente y se comparó con el espectro obtenido en la orina control contaminada con la beta-7-casomorfina. Este péptido al fragmentarse tiene una transición mayoritaria de ión y fácilmente detectable de 383.1 m/z.

3.- Análisis de las orinas problema

La técnica utilizada para la identificación de los péptidos fue la que se había puesto a punto. Como ya se ha explicado, para el análisis de péptidos y proteínas debemos seguir una técnica basada en dos pasos; la separación de las moléculas a identificar mediante cromatografía y posteriormente la identificación de los péptidos concretos mediante espectrometría de masas, fragmentación e identificación manual de la secuencia.

Las técnicas de cromatografía parecen ser un buen método para separar moléculas en líquidos biológicos como la orina y es un método sensible, reproducible y específico para separar determinadas sustancias. En este caso se realizó una separación previa de los péptidos presentes en la orina, mediante el sistema de nano-cromatografía líquida capilar de alta resolución (LC Packings). De igual manera que en la fase de preparación de la técnica, se utilizó la columna analítica C18 de fase reversa BioBasic C-18 PicoFrit. Este sistema permite el análisis cromatográfico de mezclas complejas de péptidos, por la separación según su hidrofobicidad mediante un gradiente de un compuesto orgánico (aumento de la apolaridad del medio). La beta-7-casomorfina sale al principio de las eluciones por ser un péptido más hidrófilo y de pequeño tamaño.

Se realizó la elución de los péptidos fuera de la columna cromatográfica de fase reversa C18. Se utilizó un inyector automático de muestras, refrigerado mediante Peltier (Famos), un sistema automático de cambio de tampón

mediante dos bombas y dos válvulas de diez vías (Switchos), lo que permite eluciones isocráticas o en gradiente con un compuesto orgánico (aumento de la apolaridad del medio) (hasta cuatro componentes) (Ultimate), con capacidad para proporcionar nanocaudales (nl/min).

A continuación se realizó la separación de los péptidos y su identificación con la trampa LTQ, como se había realizado en la fase piloto, tal y como viene explicado en el apartado anterior.

El procedimiento desde la recogida de la orina hasta su análisis fue el siguiente:

- La recogida de la orina de los sujetos del estudio se realizó a primera hora de la mañana. Se separaron dos alícuotas.
- Una de las alícuotas se envió directamente al Laboratorio del Hospital para su procesamiento y análisis bioquímico. La segunda alícuota se congeló a -80°C hasta su traslado al Laboratorio de Proteómica.
- Traslado al Laboratorio de Proteómica de la alícuota de la muestra de orina asegurando el mantenimiento de la cadena de frío.
- Almacenamiento de las orinas a -80°C según llegan al Laboratorio de Proteómica.

- Descongelación a temperatura ambiente en el momento de preparación de la muestra.
- Centrifugación a 4°C, 3000 rpm durante 4 minutos.
- Filtración del sobrenadante en filtros 0,22 µm.
- Desalado de 2 µl de cada muestra por cromatografía en precolumna de fase reversa C18 (PepMap™ C18 µ-precolumna, 300 µm i.d. × 1 mm, Dionex), con resina tipo poros R2® empacada manualmente según método de la primera fase de desarrollo de la técnica. Los péptidos fueron eluidos con acetonitrilo (ACN) al 95% en ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%.
- Concentración (liofilización) en Speed-vac. Disolución en 20 µl de ácido fórmico.
- Almacenamiento de las muestras a -20 °C hasta el momento del análisis en el espectrómetro de masas.
- Separación de los péptidos mediante cromatografía de fase reversa, por un sistema de nano-cromatografía líquida capilar de alta resolución.
- Después se analizaron las muestras mediante espectrometría con LTQ.
- El reconocimiento del perfil espectrométrico se evalúa mediante una

herramienta informática (Mascot) que busca en una base de datos proteómica (Swissprot) donde se encuentra el perfil de nuestro péptido.

4.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El tamaño muestral no se podía calcular en referencia a estudios previos que hubieran demostrado la presencia de beta-7-casomorfina en orina de sujetos con autismo y controles, por ausencia de datos positivos disponibles. Tampoco existen estos datos respecto a otras patologías psiquiátricas. Tomando una actitud conservadora y dado que no es esperable encontrar dicho péptido en población sana calculamos que sólo íbamos a encontrarlo en un 10 % de los controles y consideramos la posibilidad de que la mitad de nuestra muestra (dado que tenían todos ellos problemas digestivos funcionales) pudiera tener péptidos exógenos en orina por un aumento inespecífico de permeabilidad intestinal. Teniendo en cuenta este hipotético porcentaje de presencia de beta-7-casomorfina en la orina de 10 % en controles y 50 % en pacientes, considerando un error alfa de 5% y un poder estadístico de 80 %, cada grupo debería tener al menos 15 sujetos (DSS research tools). Dada la falta de soporte empírico para nuestros cálculos, decidimos reclutar el doble de muestra para hacer más factible un resultado positivo.

Se trataron los datos mediante tres test estadísticos:

1.- Chi cuadrado para el estudio comparativo de las variables categóricas entre grupos (género). En el caso de la variable principal (presencia de beta-7-casomorfina en orina) y dado que había muchas celdas con valor igual a 0, se realizó el test no paramétrico de Mann-Whitney.

2.- t de Student para comparar las medias en las variables cuantitativas (edad, osmolaridad, creatinina).

3.- Para determinar la posibilidad de que variables como el diagnóstico, la osmolaridad o la creatinina (variables independientes) fueran las responsables de la detección o no de la beta-7-casomorfina (variable dependiente) en las orinas, se realizó un análisis de los datos por regresión logística.

Se realizaron análisis de dos colas y se estableció la significación estadística en $p < 0,05$. Todos los análisis se realizaron con el programa SPSS versión 15.0.

4.6.- ASPECTOS ÉTICOS.

El estudio se ha realizado en el Servicio de Psiquiatría del Niño y del Adolescente del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. El estudio fue aprobado antes de su inicio por el Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital. Se adjunta copia de la aprobación del Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid y copias de la autorización del Hospital para la realización del estudio y del informe favorable de la Comisión de Investigación de la Fundación de Investigación del Hospital Gregorio Marañón (Anexo 4).

Todos los pacientes y controles mayores de 12 años con capacidad para consentir y todos los padres y tutores firmaron un Consentimiento Informado después de ser informados del estudio.

El tratamiento de los datos se ha realizado cumpliendo con lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal, la Ley 41/2002 de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica y la Ley 14/2007 de 3 de julio, de Investigación Biomédica.

La base de datos se analizó anónimamente. El personal de los laboratorios bioquímico y de proteómica que realizaron e informaron de los resultados se

mantuvieron en todo momento ciegos al estatus paciente/control de los sujetos.

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA. FASE 1.

- *Resultados de la puesta a punto de la técnica*
 - **Resultados de la disolución acuosa de la beta-7-casomorfina**
 - **Resultados de las muestras de orina patrón**
- *Discusión de los resultados de la puesta a punto de la técnica*
 - **Beta-7-casomorfina. Aspectos moleculares**
 - **Limitaciones de las técnicas cromatográficas en la identificación de sustancias**
- *Conclusiones parciales (puesta a punto de la técnica)*

5.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LAS ORINAS DE CASOS Y CONTROLES. FASES 2 Y 3.

- *Resultados y discusión de la muestra preliminar. Fase 2.*
 - **Resultados de la muestra preliminar**
 - **Discusión de los resultados de la muestra preliminar**
 - Detección de péptidos en orinas de pacientes con enfermedades neurológicas
 - Peptiduria y proteínas dietéticas en los TEA
 - Limitaciones de las técnicas cromatográficas en la identificación de sustancias de las orinas de sujetos con patología neuropsiquiátrica

- Patología gastrointestinal en los TEA
- Sistema inmune en los TEA
- Sistema inmune y sistema nervioso en los TEA
- Sistema inmune y sistema digestivo en los TEA
- Aumento de permeabilidad intestinal en los TEA
- Alteraciones en la actividad de la dipeptidil peptidasa IV en los TEA
- Influencia de la beta-7-casomorfina sobre el comportamiento en los TEA
- Hipótesis opioide en los TEA
- Dietas libres de gluten y caseína en los TEA
- Influencia de las dietas libres de gluten y caseína sobre el status nutricional en los TEA
- **Conclusiones parciales (muestra preliminar)**
- o *Resultados y discusión de la muestra total. Fase 3.*
 - **Resultados de la muestra total**
 - **Discusión de los resultados de la muestra total**
 - **Conclusiones parciales de los resultados de la muestra total**

5.1.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA. FASE 1.

Resultados de la puesta a punto de la técnica

Disolución acuosa de la beta-7-casomorfina

El análisis de la disolución acuosa del estándar mediante MALDI-TOF/TOF nos permitió detectar e identificar el péptido beta-7-casomorfina con una masa de 790,4 Da.

Se identificó la secuencia del péptido mediante fragmentación, obteniendo dicha secuencia mediante interpretación manual del espectro MS/MS, así como mediante la búsqueda en la base de datos de Swissprot, utilizando como motor de búsqueda MASCOT. Con esta técnica se llegó a la identificación significativa del péptido, beta-7-casomorfina (figuras 5.1 y 5.2)..

Figura 5.1. Identificación de beta-7-casomorfina mediante MASCOT

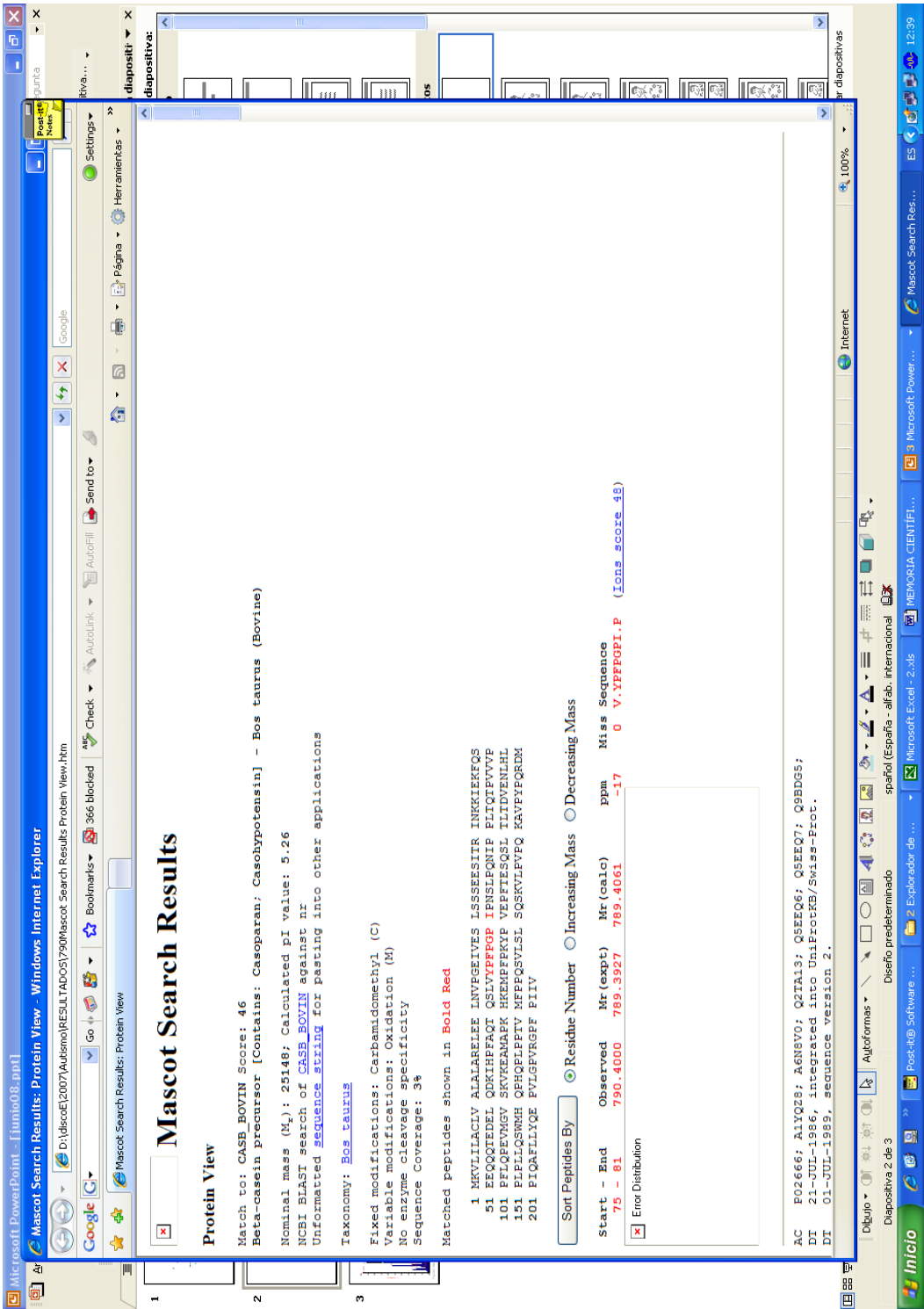
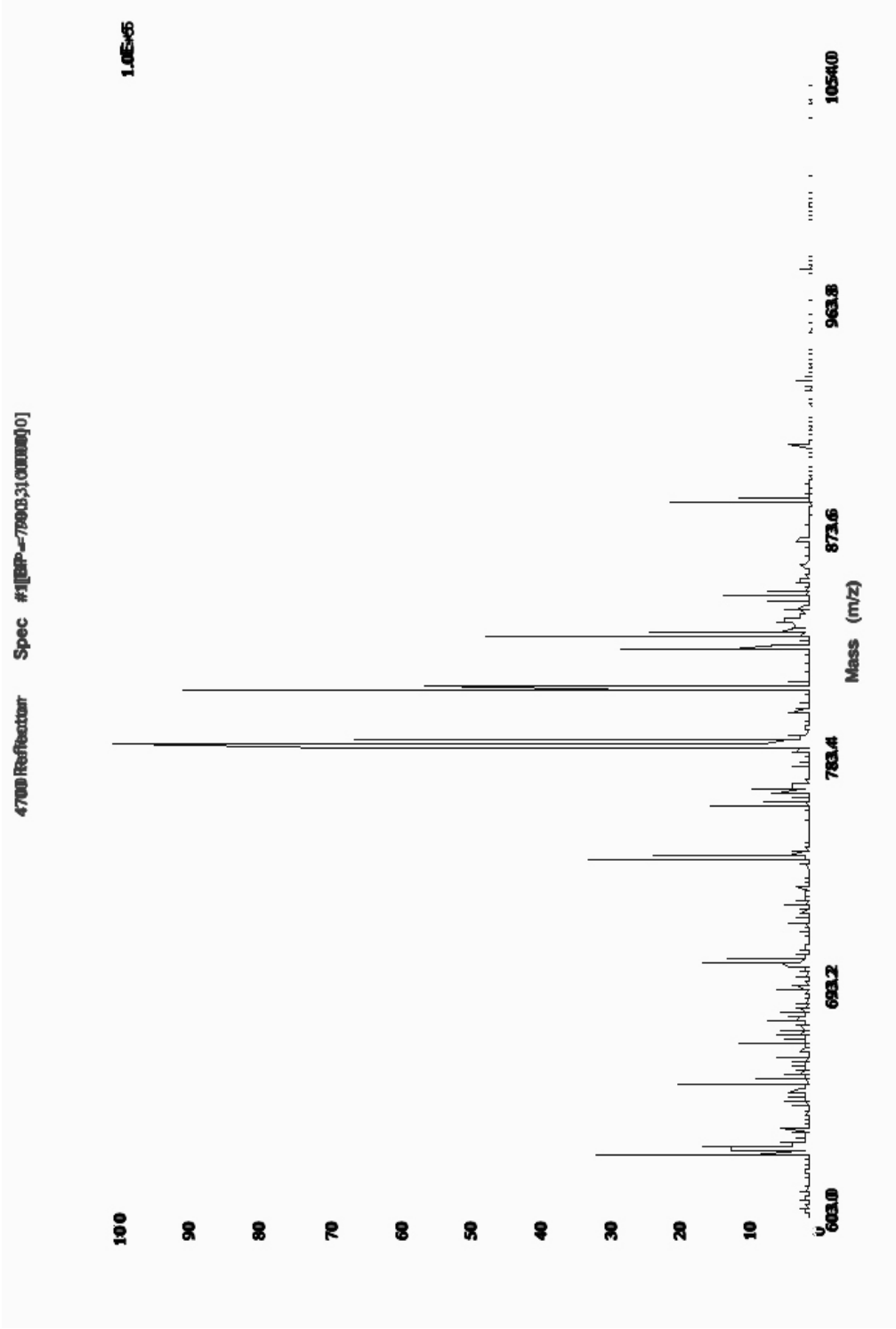


Figura 5.2. Secuenciación manual del espectro ms/ms correspondiente al péptido 790.4 Da con masa idéntica a la de la beta-7-casomorfina



Resultados de las muestras de orina patrón

El análisis de la muestra con el estándar mediante espectrometría LTQ nos permitió detectar e identificar el péptido beta-7-casomorfina a una concentración final de 0,1 ng/ml.

Además se identificaron aductos de sales (Na) a 22 Da de diferencia y otra señal de 887 Da correspondiente al péptido beta-8-casomorfina que se identificó por fragmentación (figuras 5.3, 5.4 y 5.5).

Figura 5.3. Cromatograma

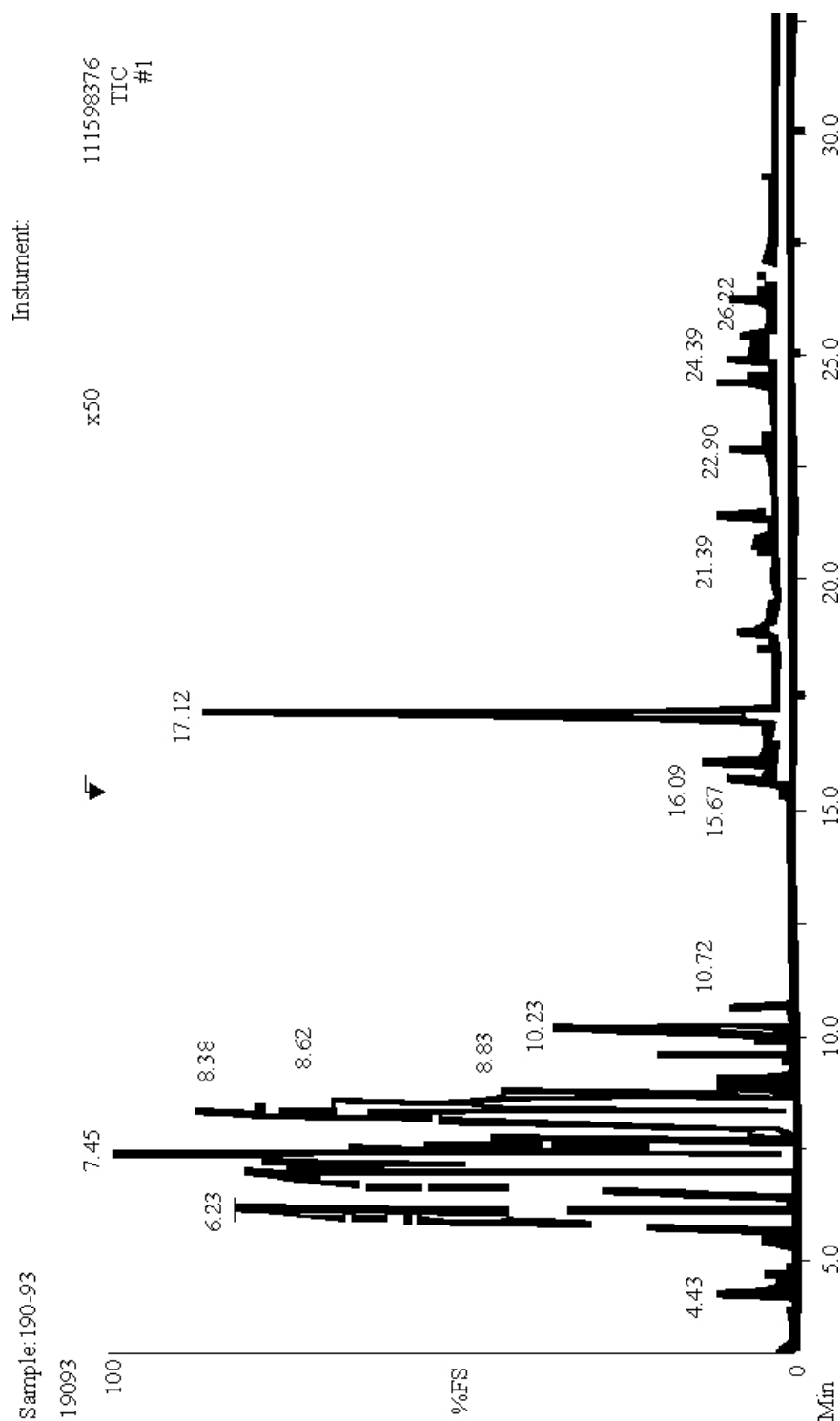
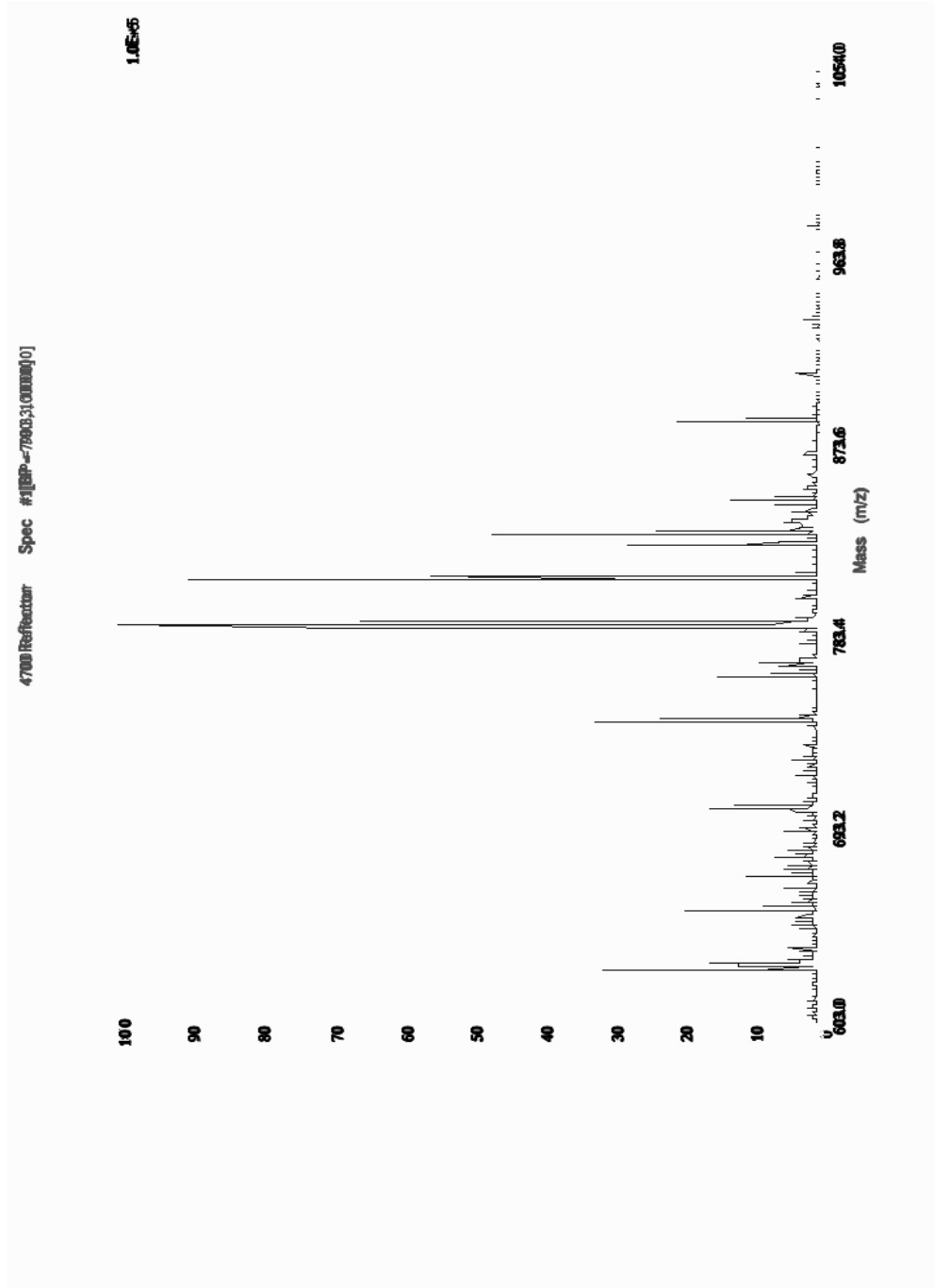


Figura 5.4. Lista de proteínas mayoritarias identificadas mediante LTQ

Q8WVW6 SCTM1_HUMAN	Secreted and transmembrane protein 1 precursor (Protein K12) - Homo sapiens (Human)
Q9UHG2 PCSK1_HUMAN	ProSAAS precursor (pro-SAAS) (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor) (Proprotein
P39060 COIA1_HUMAN	Collagen alpha-1(XVIII) chain precursor [Contains: Endostatin] - Homo sapiens (Human)
P07911 UROM_HUMAN	Uromodulin precursor (Tamm-Horsfall urinary glycoprotein) (THP) - Homo sapiens (Human)

Figura 5.5. Espectrometría de la beta-7-casomorfina en orinas patrón en concentración de 0,1 ng/ml.



Discusión de los resultados de la puesta a punto de la técnica

Hemos conseguido detectar beta-7-casomorfina con cromatografía acoplada a espectrometría y secuenciación por Mascot en orina contaminada con beta-7-casomorfina estándar con una sensibilidad de 0,1 ng/ml.

La beta-7-casomorfina es un heptapéptido de estructura bien definida y se encuentra incluida en las bases de datos de proteómica. Una ventaja añadida es que existe beta-7-casomorfina en forma comercial con el fin de utilizarla como control y poder comprobar las posibilidades de la técnica para su detección en muestras menos complejas que la orina, como soluciones acuosas, tal y como se ha hecho en la fase de puesta a punto de este trabajo.

A pesar de la complejidad de la muestra, no hay supresión iónica, lo que nos permite emplear esta técnica que a su vez presenta las ventajas de rapidez en el análisis y robustez.

Beta-7-casomorfina. Aspectos moleculares

La beta-7-casomorfina procede de la digestión de la beta-caseína de la variante genética A1 de la leche bovina y debido a su estructura, es muy resistente a la proteólisis incluso de proteasas y pronasas, enzimas específicas para escindir

enlaces aminoacídicos con un residuo prolina (283).

La beta-7-casomorfina está comprendida en un grupo más amplio molecular definido como las beta-casomorfina, que representan un grupo de péptidos originarios de la beta-caseína de la leche dentro de la secuencia 60-70 de ésta, todas empezando por el residuo 60 Tyr y con una cadena de longitud de 4–11 aminoácidos. Este grupo de péptidos son liberados de la beta-caseína de la leche de forma natural en el organismo. Se aislaron por primera vez por digestión enzimática de la caseína y también han sido obtenidos por hidrólisis con pepsina a partir de fracciones bovinas de la alfa-s1-caseína (264).

El péptido derivado de la leche y centro de nuestro trabajo es la beta-7-casomorfina, llamada así por su origen exógeno (derivado de la caseína) y su actividad similar a la morfina (284) (283).

Los péptidos opioides endógenos típicos tienen una secuencia N-terminal definida. Contienen la secuencia tirosina-X-fenilalanina o tirosina-X-Y-fenilalanina o tirosina, donde X e Y son aminoácidos no determinados y donde la tirosina en posición 1 es absolutamente necesaria para la actividad opioide. Típicamente el segundo residuo es un aminoácido aromático, como una fenilalanina o tirosina y también está presente en la posición tercera o cuarta. Esta estructura se une muy bien a las zonas de unión del receptor opioide. Los péptidos derivados de la leche de actividad opioide más potente también contienen una prolina en segunda posición que es crucial en su función ya que mantiene la orientación adecuada de las cadenas laterales de la tirosina y la

fenilalanina (285).

En el caso de la beta-7-casomorfina su secuencia N-terminal, Tyr-Pro-Phe, cumple con este tipo de estructura con capacidad de unión a receptores opioides, una Tyr amino terminal y dos residuos aromáticos en segunda y tercera posición.

En resumen, la beta-7-casomorfina es un heptapéptido de secuencia Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile contenido en la secuencia de la beta-caseína (284), corresponde a las posiciones 60-66 de la secuencia de aminoácidos de la beta-caseína bovina. Se atribuye su actividad opioide a la secuencia Tyr-Pro-Phe del extremo N-terminal.

Limitaciones de la técnicas cromatográficas en la identificación de sustancias

Todos los estudios que han buscado la presencia de beta-7-casomorfina en las orinas, han utilizado columna cromatográfica de Sephadex 25 o columna C18 en fase reversa y las eluciones se han sometido a detectores de 215 nm y a 280 nm. Aun cuando estos estudios arrojaban datos sobre la posibilidad de peptiduria en las orinas de los sujetos estudiados, estas técnicas no permiten la identificación de dichos compuestos. Dichos estudios se limitan al análisis de la presencia de péptidos con determinadas características moleculares que

resultan en un comportamiento físico-químico dado, con una determinada elución cromatográfica asociada a una determinada capacidad de absorción de luz UV a determinadas longitudes de onda. Estos estudios solo pueden concluir que hay un patrón cromatográfico “*compatible*” con la presencia de péptidos habitualmente no presentes.

A partir de aquí, estudios posteriores han intentado identificar los compuestos responsables de dicha peptiduria mediante técnicas espectrométricas que permiten la identificación concreta de los compuestos presentes en las orinas.

Las técnicas espectrométricas involucran la ionización de los componentes de la muestra en fase gaseosa y la separación de las especies iónicas resultantes de acuerdo a la relación entre la masa y la carga eléctrica (m/z), utilizando campos electromagnéticos en el vacío. Los espectrómetros de masas poseen tres componentes básicos: un sistema de ionización, un analizador de masas y un detector de iones.

En relación al sistema de ionización del espectrómetro de masas uno de los elementos esenciales es la fuente de ionización. En ella son producidos los iones al suministrar energía a la muestra que se estudia. La energía suministrada puede ser suficiente no solamente para ionizar la molécula y obtener el llamado ión molecular (la molécula intacta pero con una carga positiva o negativa) sino también para provocar la fragmentación de la molécula dando lugar a iones fragmentos. Los iones producidos son característicos de un determinado compuesto químico y por tanto es posible su identificación a

partir del espectro de masas. Las técnicas de ionización que nos interesan son el ElectroSpray Ionization (ESI) y el “Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization” (MALDI). La diferencia fundamental de los métodos de ionización es que el sistema MALDI utiliza muestras disueltas en matrices sólidas, mientras que el sistema ESI del LC-MS/MS (Cromatografía Líquida en tandem con Espectrometría de Masas), utiliza muestras en fase líquida para la generación de iones.

El segundo componente básico del espectrómetro es el analizador de campo eléctrico que puede ser un campo magnético, de tiempo de vuelo o una combinación de ellos. Es el lugar en el que los iones son separados de acuerdo a la relación masa/carga (m/z). Los analizadores de masas tienen múltiples funciones que varían de acuerdo a su tecnología; fundamentalmente se refieren al control de los campos electromagnéticos aplicados, que involucra la separación de iones, la resolución de cargas a nivel isotópico, la fragmentación y la capacidad de operación en polaridades diferentes.

El tercer componente es el detector de iones. Los detectores tienen como función detectar el flujo iónico liberado por el analizador, amplificarlo y transmitir esta señal a la computadora, donde se registra en forma de un espectro de masas. Los valores m/z que indican la relación masa-carga de los iones son dibujados en el eje de las coordenadas y la intensidad de los mismos en el eje de las abscisas. El espectro de masas evidencia el número de componentes en la muestra y el peso molecular de cada componente.

Por último, para dar eficacia a los análisis, debe de haber herramientas para la identificación automática. Estas herramientas se hacen indispensables debido a la complejidad de las muestras y de los datos a analizar y se apoyan en bases de datos comparativos de dichas moléculas, de manera que la identificación sea lo más fiable posible.

La fragmentación de péptidos, según la metodología utilizada, origina un corte específico del enlace peptídico; consecuentemente, se generarán iones de diferentes masas moleculares cuyo conjunto va a proporcionar los datos para poder resolver la secuencia del péptido. Los iones hijos generados por colisión son separados en base a su relación masa/carga (m/z) y registrados. Los valores exactos del conjunto de las masas moleculares de los péptidos es la representación única de un determinado péptido, ya que esta lista de masas moleculares está directamente relacionada con su estructura primaria y es sometida a los programas de análisis proteómico (MASCOT), para su comparación con las diferentes proteínas de las bases de datos. La comparación entre el listado de masas experimentales y teóricas es calificada por algoritmos específicos y a cada comparación se le asigna una calificación.

Hay varios estudios publicados en los que se ha intentado poner a punto técnicas proteómicas para poder detectar beta-7-casomorfina en orina de niños con TEA. Tres estudios recientes han utilizado técnicas semejantes a las utilizadas en el actual estudio para intentar identificar la presencia de beta-7-casomorfina en orina de sujetos con autismo.

El primer estudio, de Hunter y colaboradores (2003), acoplaron espectrometría LC-MS/MS (Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometric) a las columnas cromatográficas pero no consiguieron detectar beta-7-casomorfina en las orinas (89).

Dettmer y colaboradores (2007) intentaron nuevamente identificar estos péptidos que aparecían en los patrones cromatográficos mediante LC-MS/MS y en esta ocasión sí se consiguió recuperar la beta-7-casomorfina en solución acuosa patrón contaminada con beta-7-casomorfina comercial con una sensibilidad de 0,25 ng/ml y en orinas patrones (contaminadas con beta-7-casomorfina estándar) en una concentración de 250 ng/ml. Valoraron la cantidad de beta-7-casomorfina con la que se habían contaminado las orinas y que se recuperaba tras el desarrollo de la técnica y resultó ser de entre un 78 y un 94% del péptido estándar (278). Respecto a los límites de detección espectrométricos que se establecieron en el estudio de Dettmer fueron mayores de 3. Estos límites se definen como la menor concentración que daba una relación entre la señal y el ruido.

En el estudio de Cass y colaboradores (2008) se analizaron las orinas por cromatografía de alta presión (HPLC) y Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS), otra técnica espectrométrica (279). Estos autores establecieron una sensibilidad de la técnica de 0,75 microg/ml (750 ng/ml) en la detección de la beta-7-casomorfina en las orinas patrones, contaminadas con la beta-7-casomorfina estándar.

Conclusiones parciales (puesta a punto de la técnica)

Hemos conseguido desarrollar la técnica de identificación de beta-7-casomorfina en orina contaminada en laboratorio con una buena sensibilidad. La aportación fundamental de este estudio consiste en haber detectado beta-7-casomorfina en concentraciones de 0,1 ng/ml, 2500 veces superior a la sensibilidad reportada en estudios previos.

Dado los resultados positivos en la puesta a punto, suponemos que la metodología empleada para analizar directamente los péptidos extraídos de la orina es válida para llegar a detectar el péptido beta-7-casomorfina con un límite de detección de 0.1 ng/ml. Por otro lado, a pesar de la complejidad de la muestra, no hay supresión iónica, lo que nos permite emplear esta técnica que a su vez presenta las ventajas de rapidez en el análisis y robustez.

5.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LAS ORINAS DE CASOS Y CONTROLES. FASES 2 Y 3.

El análisis se planificó en dos fases: una fase preliminar coincidente con el periodo de finalización de la beca que sustentaba el proyecto y una fase final con el total de muestra recogida. Debido a la diferencia de los resultados obtenidos hemos decidido separarlos en dos grupos bien definidos: la muestra preliminar (fase 2) y la muestra total (fase3).

Resultados y discusión de la muestra preliminar

Resultados de la muestra preliminar

A fecha 3 de julio de 2009 se había terminado el reclutamiento de una submuestra de 14 sujetos que cumplían con los criterios de inclusión y exclusión y que hemos denominado muestra preliminar. En ese momento se decidió realizar un análisis preliminar en coincidencia con la finalización de la beca que sostenía económicamente este proyecto (Fundación Mutua Madrileña 2008). De los resultados que se obtuvieron se hizo un análisis estadístico preliminar. Esta primera muestra estaba constituida por orinas recogidas entre julio del 2008 y junio del 2009, de manera que el tiempo que habían permanecido en el congelador (a -80º) era de entre 30 días y 1 año.

Por su relevancia, de cara a la discusión posterior, se procede a especificar los resultados en la submuestra de los 14 casos iniciales.

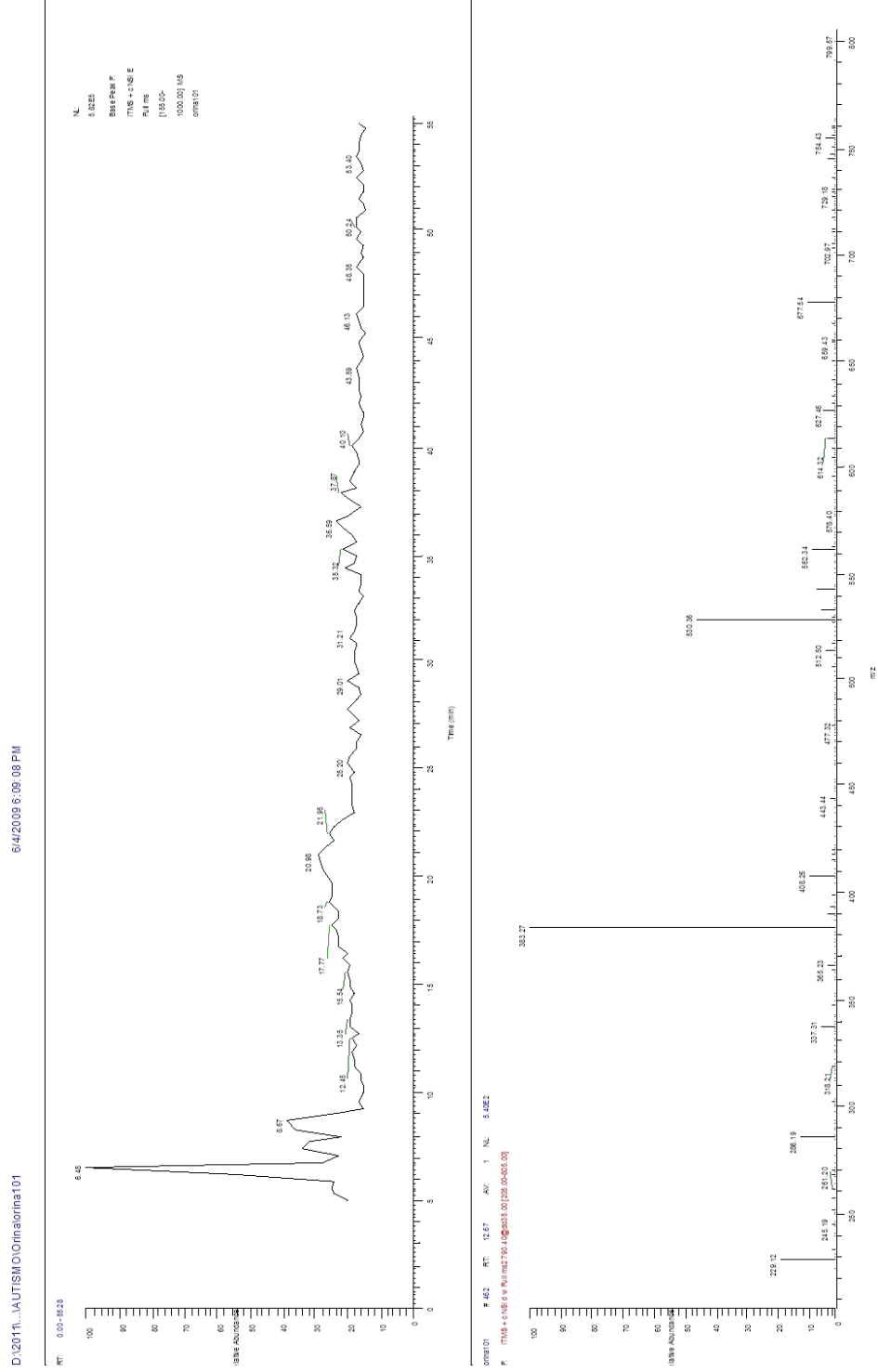
A continuación se detallan los resultados en cada una de las muestras del análisis preliminar.

Tabla 5.1. Presencia de beta-7-casomorfina en los sujetos de la muestra preliminar

Muestra	Muestra	Detección de beta-7-casomorfina
1	Caso	Confirmado
2	Caso	Confirmado
3	Caso	Confirmado
4	Caso	Confirmado
5	Caso	Confirmado
6	Caso	Confirmado
9	Control	No detectado
10	Caso	No detectado
11	Control	No detectado
12	Caso	Confirmado
13	Control	No detectado
15	Caso	Confirmado
17	Caso	Confirmado
19	Control	Confirmado

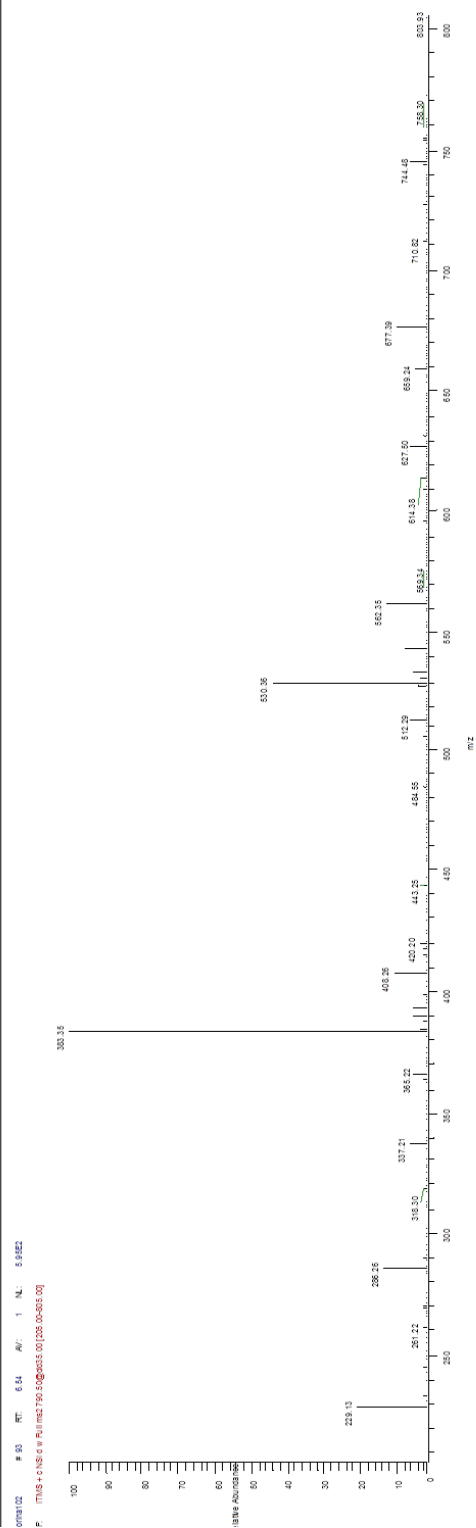
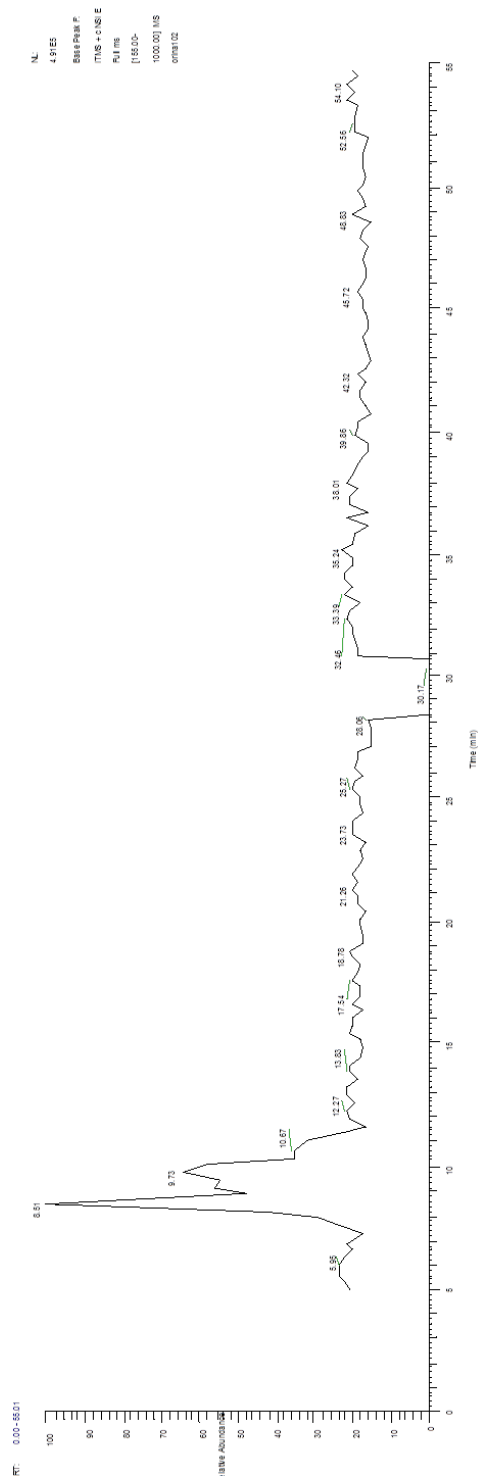
A continuación se presentan cada una de las gráficas espectrométricas de los 14 sujetos de la muestra preliminar:

MUESTRA 1. CASO. CONFIRMADO

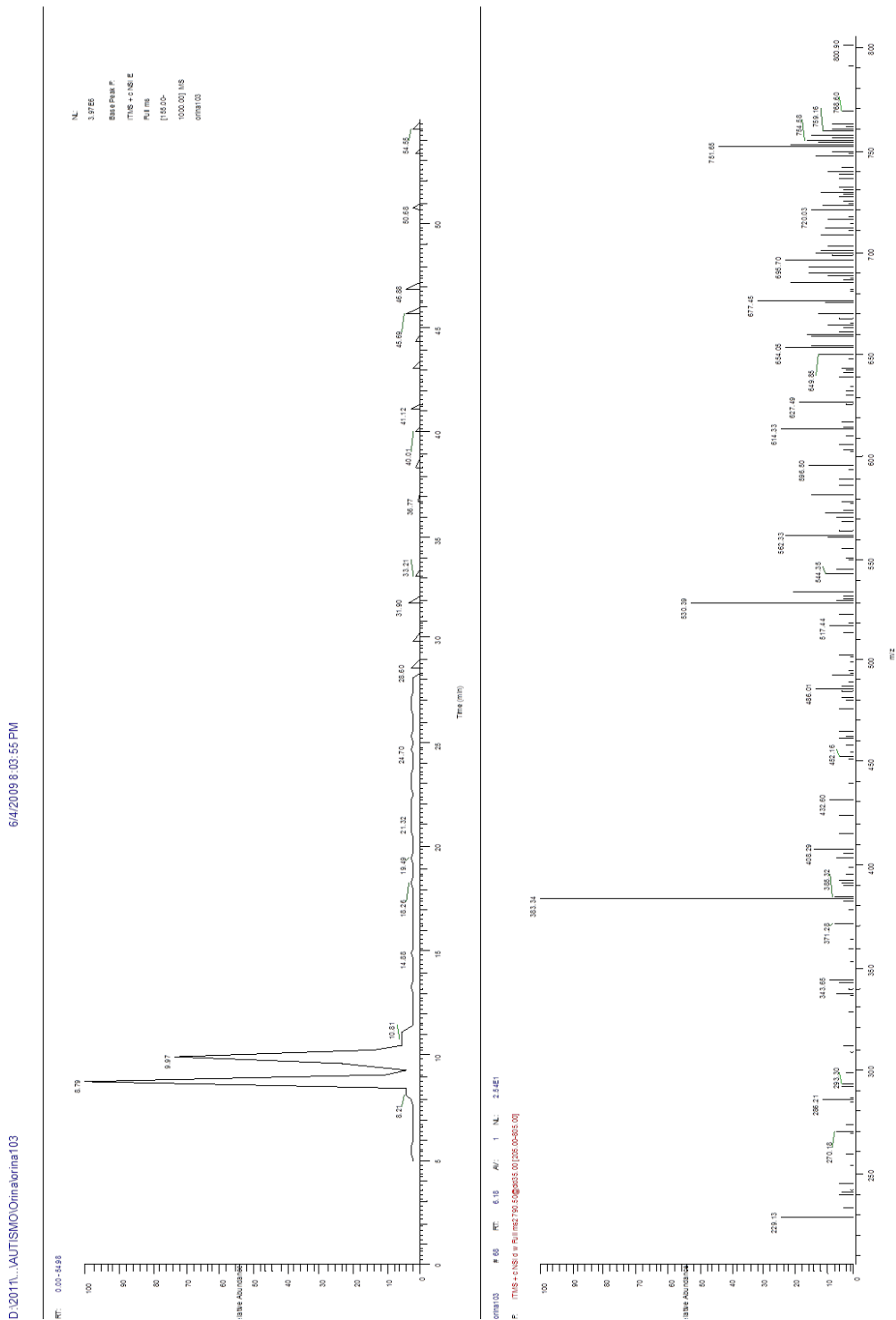


D:\2011\...\AUTISMO\Orina\brina102

6/4/2009 7:06:26 PM

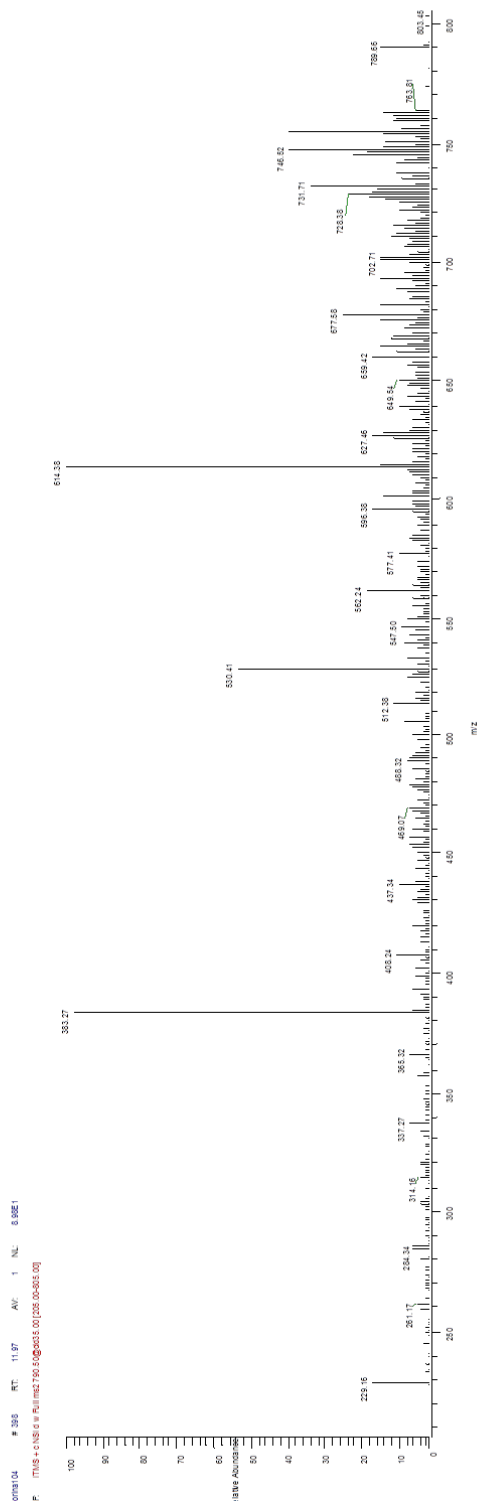
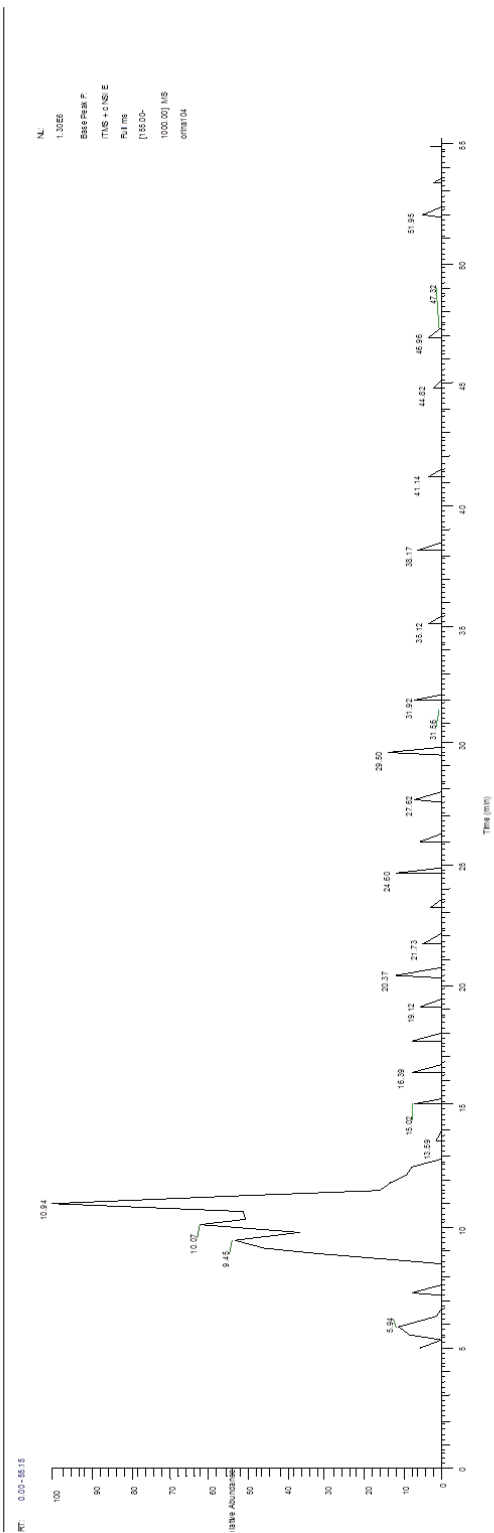


MUESTRA 3. CASO. CONFIRMADO.

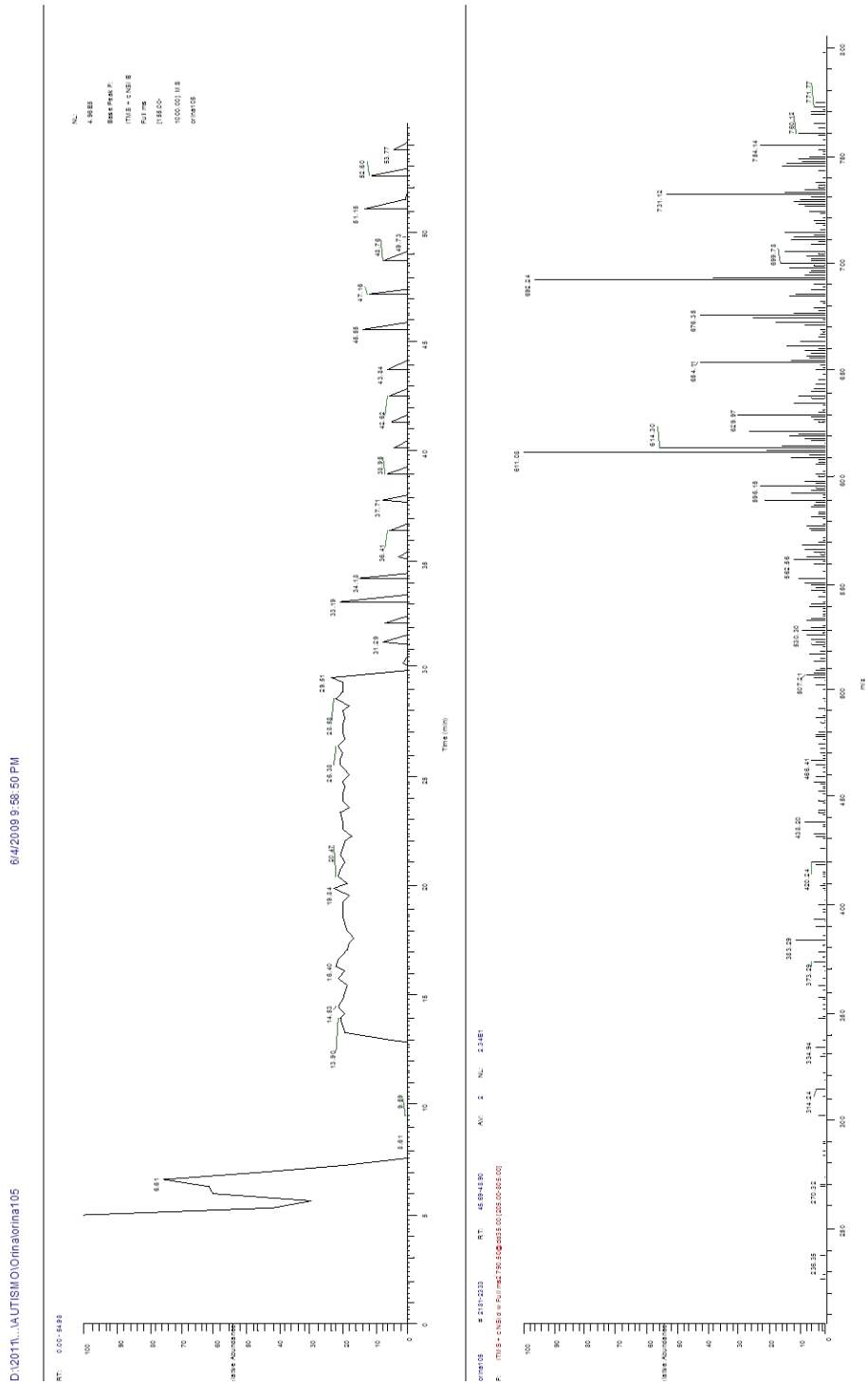


D:\2011\...AUTISMO\Orina\brina104

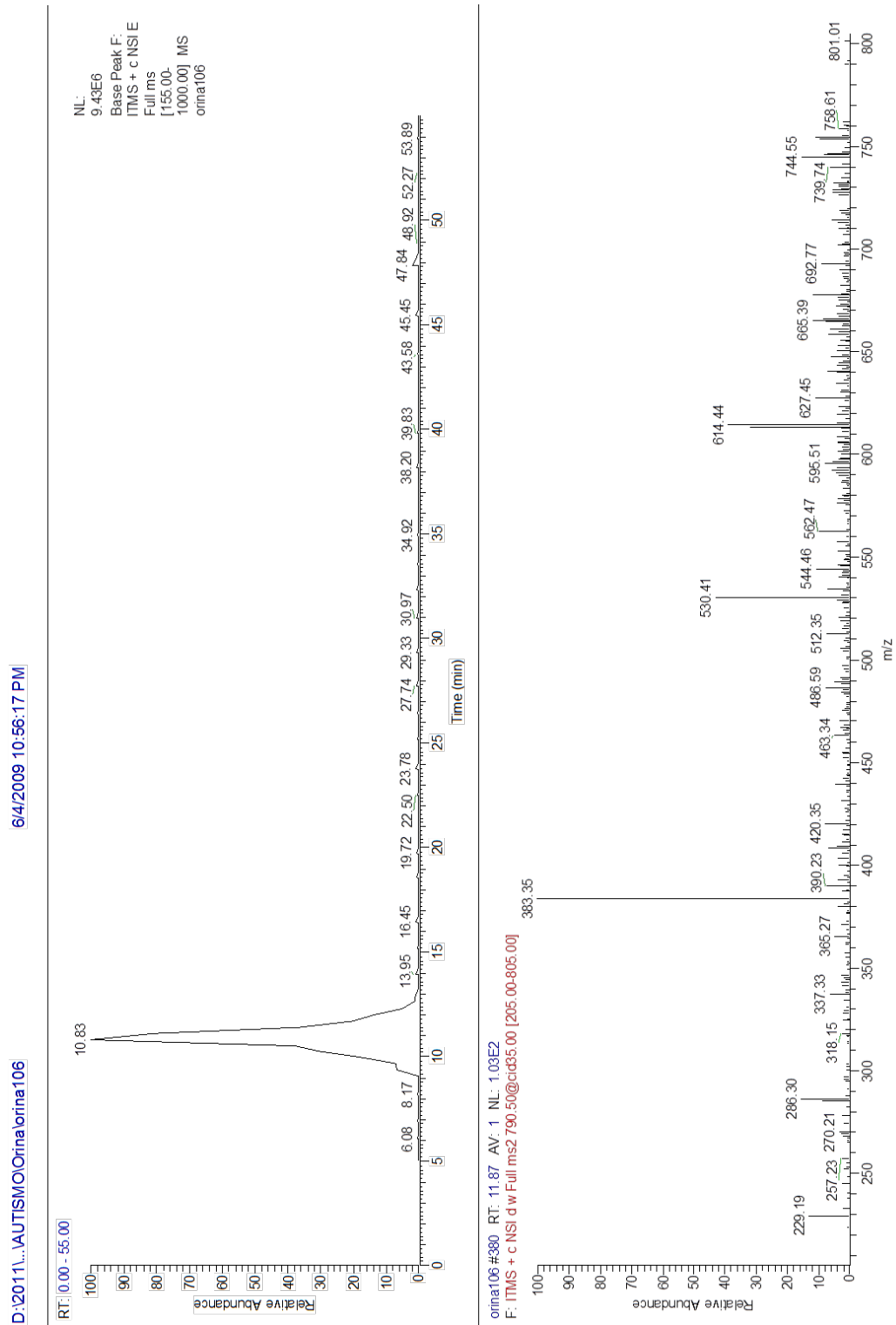
6/4/2009 9:01:22 PM



MUESTRA 5. CASO. CONFIRMADO.



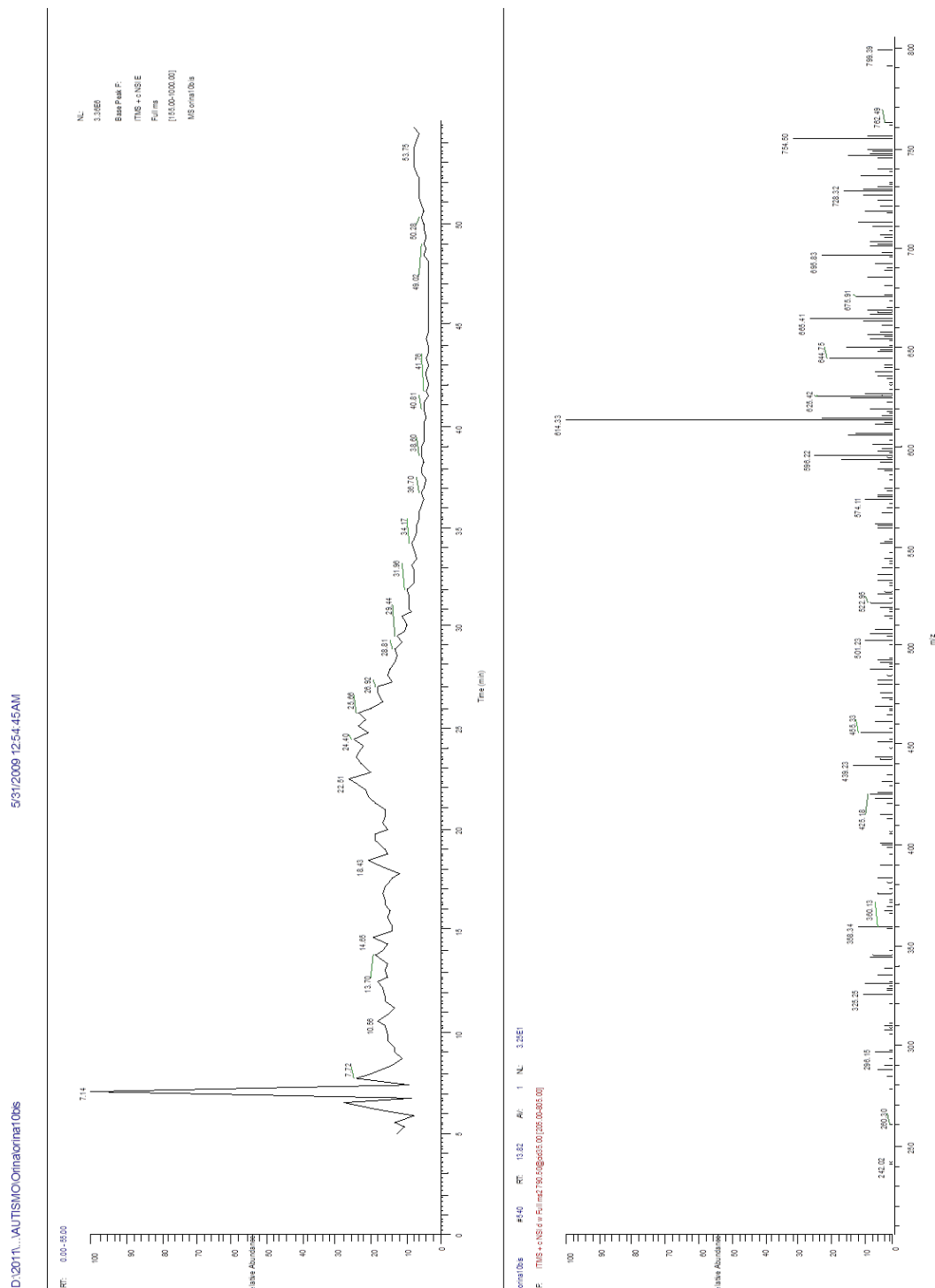
MUESTRA 6. CASO. CONFIRMADO.



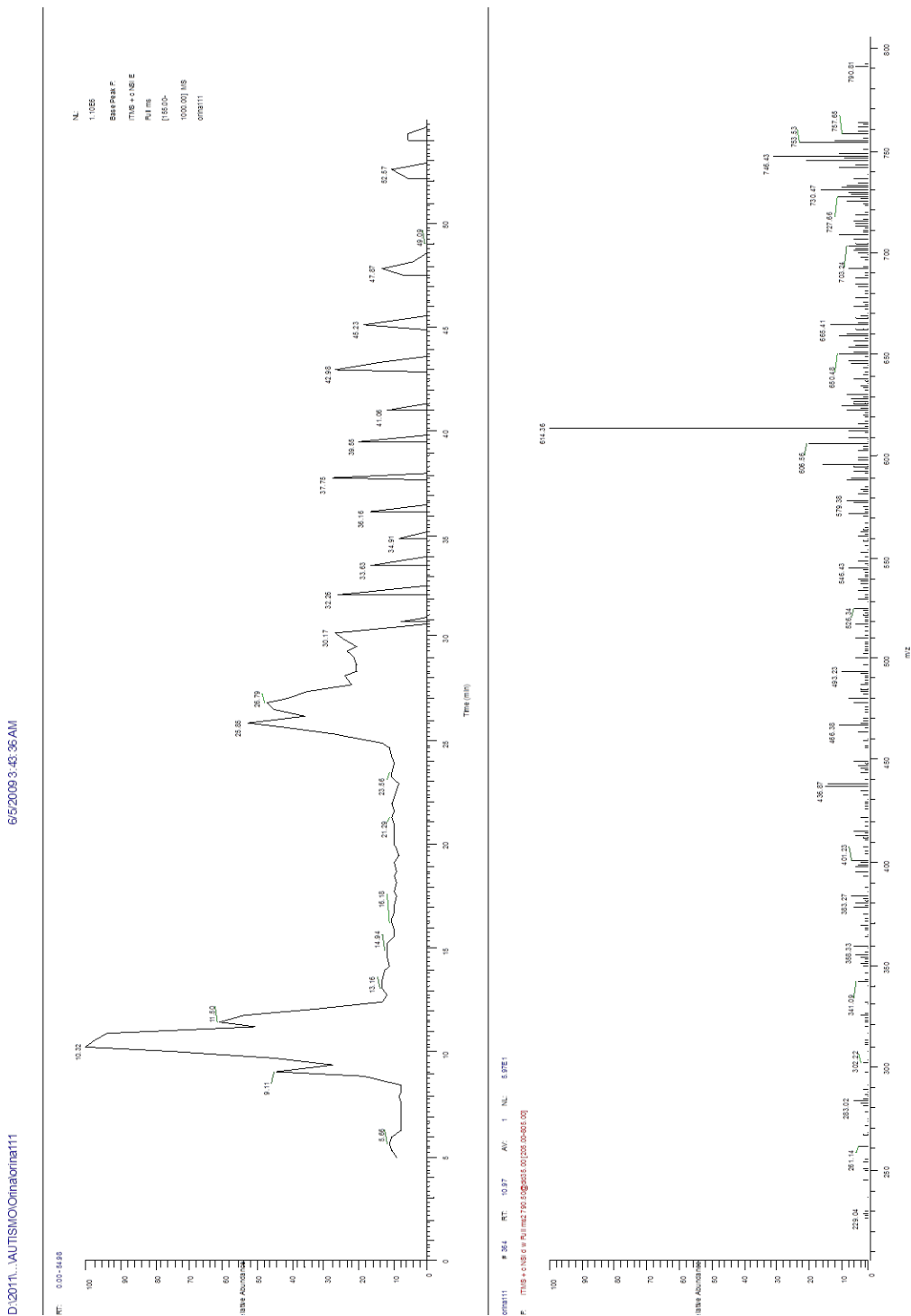
D:\2011\...\AUTISMO\Orina\orina108



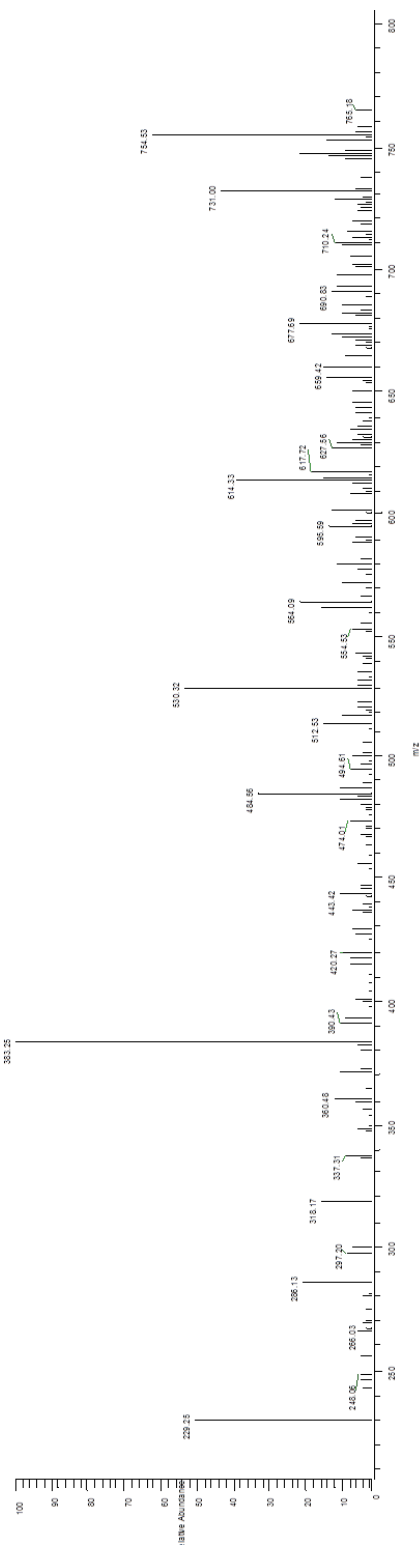
MUESTRA 10. CASO. NO DETECTADO.



MUESTRA 11. CONTROL. NO DETECTADO.



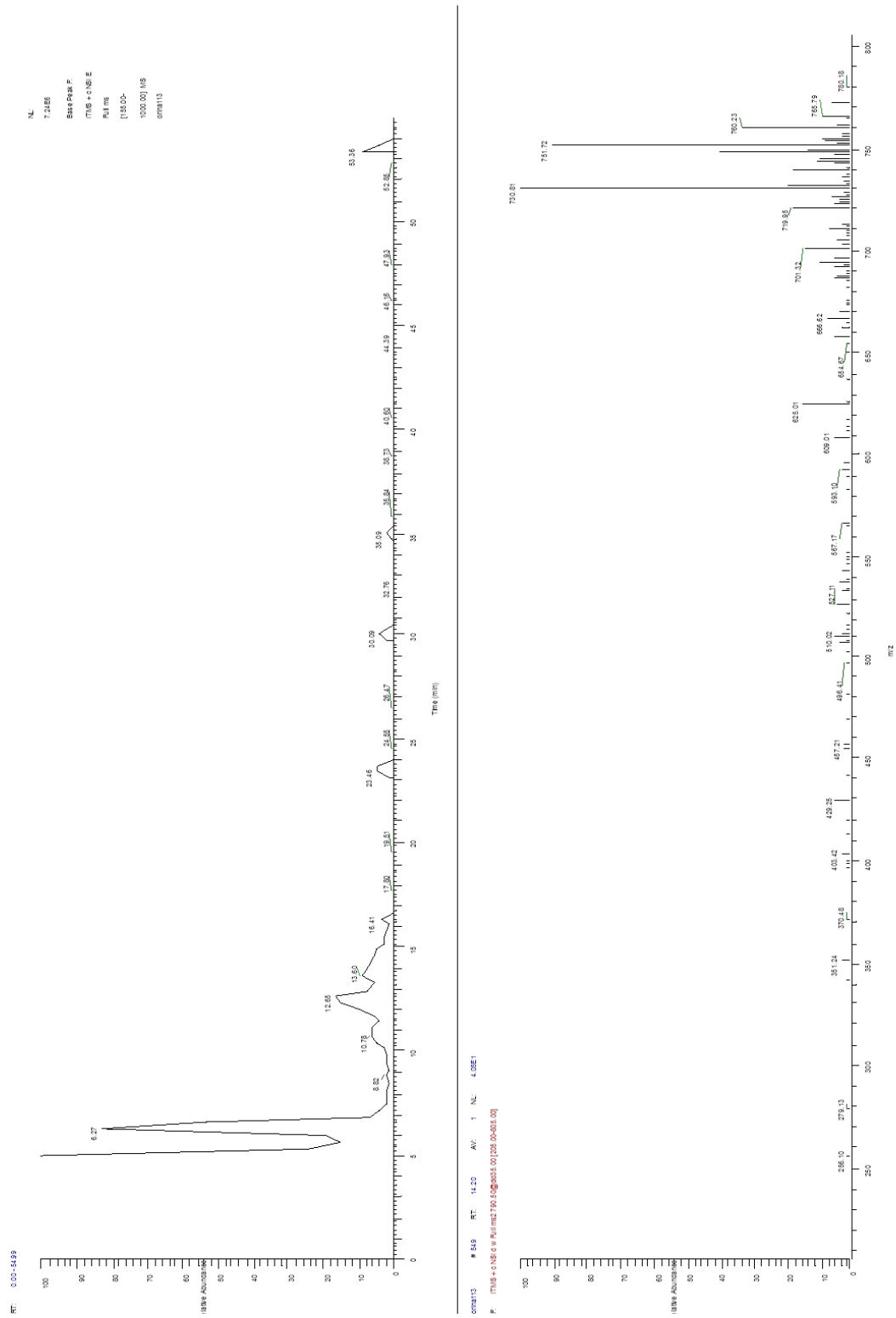
D:\2011\...AUTISMO\Orina\brina112



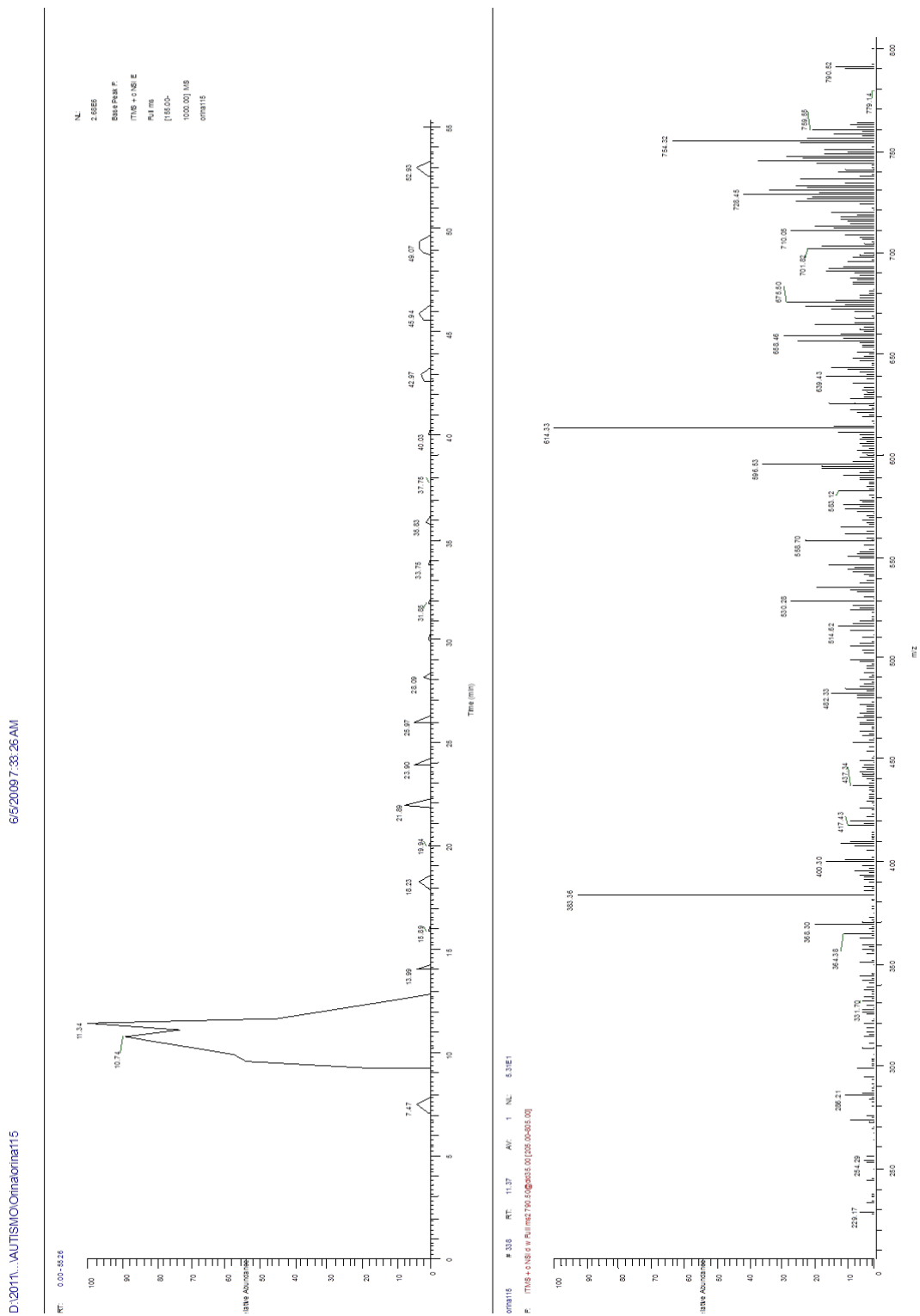
MUESTRA 13. CONTROL. NO DETECTADO

D:\2011\AUTISMO\Ornatorn13

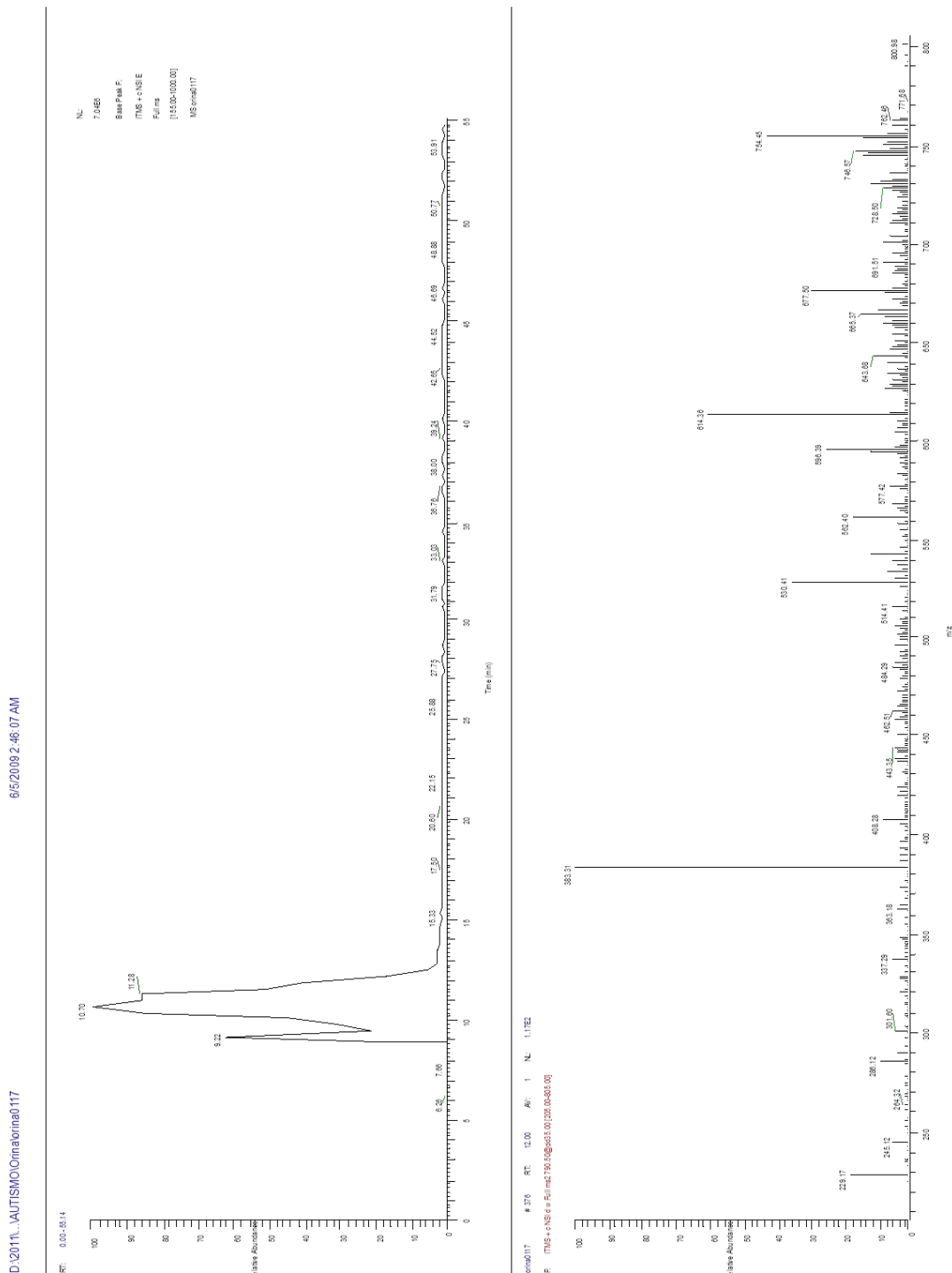
6/5/2009 5:38:31 AM



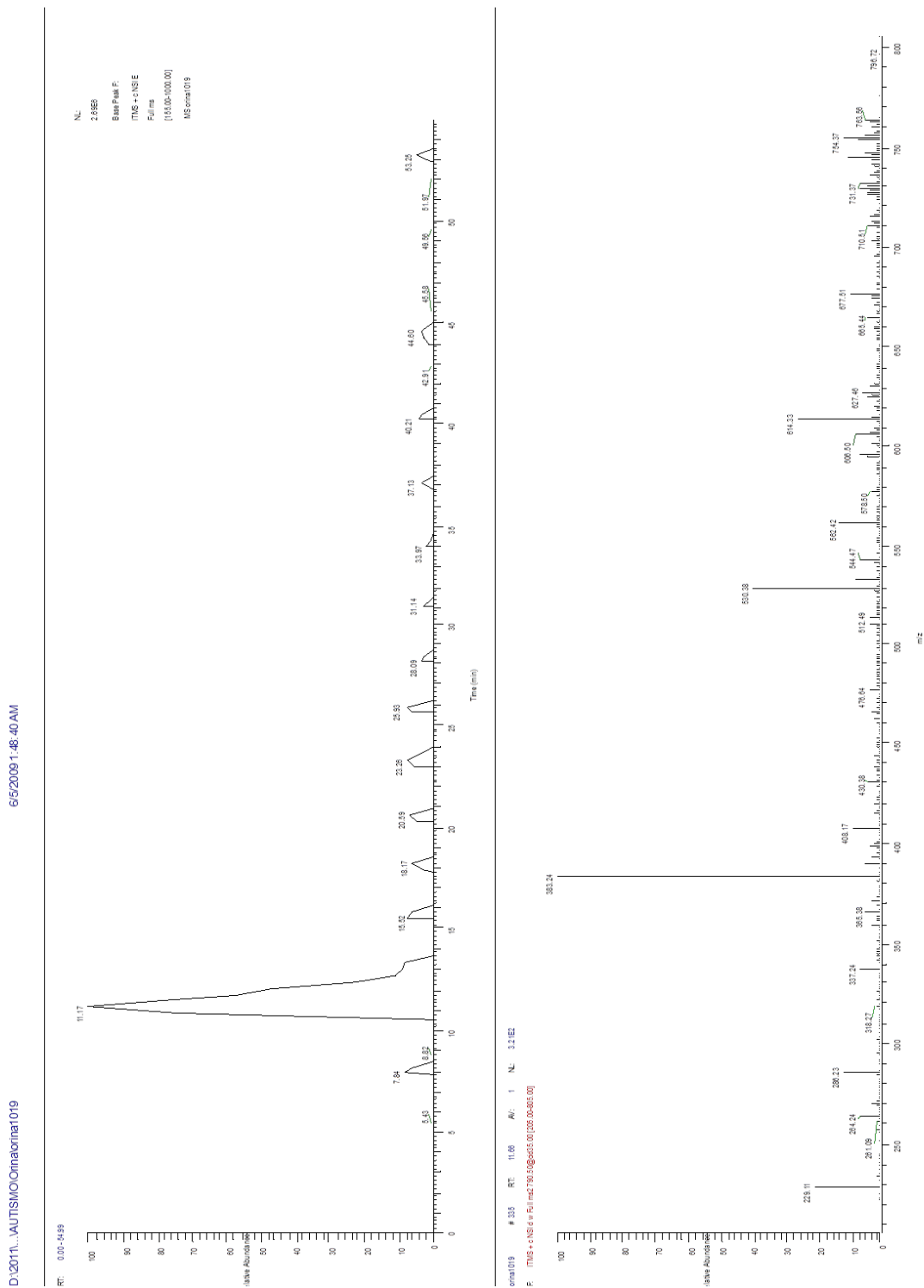
MUESTRA 15. CASO. CONFIRMADO.



MUESTRA 17. CASO. CONFIRMADO.



MUESTRA 19. CONTROL. CONFIRMADO.



Tablas sociodemográficas y clínicas de la muestra preliminar

Como se puede observar en la tabla 5.2, no hay diferencias de género ni de edad entre los dos grupos, pacientes y controles, ni tampoco en los valores de osmolaridad ni creatinina.

Tabla 5.2. Datos sociodemográficos y clínicos en la muestra preliminar.

	Casos (N=10)		controles (N=4)		VALOR ESTADISTICO	
SEXO(varones)N (%)	8 (80)		3 (75)		$\chi^2=0,042$	p=1,000
	M	D.E.	m	D.E.	t	p
Edad	11	2,94	10,5	2,08	0,307	0,76
Osmolaridad	799,0	172,0	986,7	80,1	-2,057	0,06
Creatinina	105,6	49,2	154,4	46,2	-1,701	0,11

Dentro de los sujetos con TEA, un 40% presentaron estreñimiento funcional (ROMA VI), un 30% aerofagia (ROMA VIII), un 20% síndrome de colon irritable (ROMA II), un 20% migraña abdominal (ROMA III), un 10 % dolor abdominal funcional (ROMA V) y un 10% incontinencia fecal no retentiva (ROMA VII).

Ningún caso presentó dispepsia funcional, síndrome de dolor abdominal funcional, síndrome de vómitos cíclicos ni síndrome rumiante de adolescente.

Tabla 5.3. Alteraciones digestivas funcionales en los casos (N=10) de la muestra preliminar. Resultados del cuestionario Roma III-QPGS (The Questionnaire on Paediatric Gastrointestinal Symptoms)

	Roma I	Roma II	Roma III	Roma IV	Roma V	Roma VI	Roma VII	Roma VIII	Roma IX	Roma X
Casos (N=10) n (%)	0 (0)	2 (20)	2 (20)	1 (10)	0 (0)	4 (40)	1 (10)	3 (30)	0 (0)	0 (0)

Por protocolo, todos los controles presentaban ROMA negativa.

En la tabla 5.4 se presentan los resultados principales, la presencia o no de beta-7-casomorfina en los sujetos de la muestra preliminar. Como puede verse, la beta-7-casomorfina se presenta en el 90 % de los casos (9/10) y en el 25 % de los controles (1/4), lo cual es una diferencia estadísticamente significativa (tabla 5.4.).

Tabla 5.4. Presencia de beta-7-casomorfina en orina de pacientes y controles en la muestra preliminar

	Casos (N=10)	Controles (N=4)	U	p
BCM + n (%)	9 (90)	1 (25)	5,92	0,041

BCM+: Presencia de beta-7-casomorfina

Tabla 5.5. Edad media en los grupos con presencia de beta-7-casomorfina y ausencia de la misma, en la muestra preliminar.

	BCM + (N=10)		BCM - (N=4)		Valores estadísticos	
	M	D.E.	M	D.E.	T	p
edad	10,9	3,03	10,75	1,70	0,117	0,909

BCM+: Presencia de beta-7-casomorfina.

BCM-: Ausencia de beta-7-casomorfina.

No hay relación entre la edad de los sujetos y la presencia de beta-7-casomorfina. No existen diferencias de edad entre los grupos con beta-7-casomorfina positiva o negativa.

Todos los pacientes con TEA que presentaban síndrome de colon irritable (Roma II), dolor abdominal funcional (Roma IV), estreñimiento funcional (Roma VI), incontinencia fecal no retentiva (Roma VII) o aerofagia (Roma VIII) tenían beta-7-casomorfina identificable en orina. Asimismo, se identificó el péptido en el 50 % de los que presentaban migraña funcional (Roma III) (tabla 5.6.)

Tabla 5.6. Presencia de BCM en función de los distintos síndromes digestivos en los sujetos con TEA (N=10)

	BCM + N(%)	BCM – N(%)	U	p
Roma II (N=2)	2 (100)	0 (0)	3,5	0,8
Roma III (N=2)	1 (50)	1 (50)	0,5	0,2
Roma IV (N=1)	1 (100)	0 (0)	4,0	1
Roma VI (N=4)	4 (100)	0 (0)	2,5	0,6
Roma VII (N=1)	1 (100)	0 (0)	4,0	1
Roma VIII (N=3)	3 (100)	0 (0)	3,0	0,8

BCM+: presencia de beta-7-casomorfina

BCM-: Ausencia de beta-7-casomorfina

U. U de Mann-Whitney.

Para determinar la posibilidad de que la presencia de beta-7-casomorfina estuviera influida no solo por el diagnóstico sino por variables como la edad, osmolaridad o función renal (medida por la creatinina), realizamos un modelo de regresión donde la presencia de beta-7-casomorfina sería la variable dependiente y el grupo diagnóstico, edad, osmolaridad y creatinina serían las variables independientes (ver tabla 5.7)

El modelo completo que contiene todos los factores es estadísticamente significativo χ^2 (gl=1, N=14)=5,751, $p<0,016$, de modo que el modelo es válido para diferenciar aquellos sujetos que presentan o no beta-7-casomorfina. El modelo de forma global explica entre un 33,7 % (Cox and Snell R square) y un 48,3 % (Nagelkerke R squared) de la varianza de la presencia de beta-7-casomorfina en la muestra y clasifica correctamente el 85,7 % de los casos (lo que mejora la predicción de un modelo que no incluye nuestras variables independientes, que predecía la correcta adjudicación de los casos en un 71,4 %). Como se muestra en la tabla 5.7 sólo la variable del grupo diagnóstico contribuye al modelo de forma estadísticamente significativa, con una odds ratio de 27,2 (IC 95 % entre 1,26 y 500). Es decir, tener el diagnóstico de TEA aumenta 27 veces la posibilidad de detectar beta-7-casomorfina en orina. Como puede verse el intervalo de confianza es grande porque la n de la muestra es muy pequeña.

El modelo presenta una sensibilidad del 90 % y una especificidad del 75 %, con un valor predictivo positivo del 90 %.

Tabla 5.7. Presencia de beta-7-casomorfina en función de grupo diagnóstico, edad, osmolaridad y creatinina en la muestra preliminar.

Variables en la ecuación		B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	I.C. 95,0% para EXP(B)	
		Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior
Paso 1(a)	grupo(1)	3,296	1,563	4,444	1,000	0,035	27,020	1,260	500,000
	Constante	2,197	1,054	4,345	1,000	0,037	9,000		
a	Variable(s) introducida(s) en el paso 1: grupo.								

Variables que no están en la ecuación					
			Puntuación	gl	Sig.
Paso 1	Variables	edad	0,026	1,000	0,871
		osmolaridad	0,819	1,000	0,366
		creatinina	0,394	1,000	0,530
	Estadísticos globales		1,785	3,000	0,618

Discusión de los resultados de la muestra preliminar

Hemos conseguido detectar mayor presencia de beta-7-casomorfina en orina de pacientes con TEA y alteraciones digestivas funcionales que en orinas de sujetos control.

El análisis de identificación de los péptidos en orina es un proceso complejo que pocos laboratorios acometen. La orina es una muestra biológica “sucia”, con muchos elementos en suspensión, células, bacterias, moléculas complejas, pigmentos..., donde es difícil separar por métodos físico-químicos, tanto moléculas de bajo peso molecular como péptidos pequeños. En general, para este tipo de análisis, se utiliza previamente un sistema de separación cromatográfico de moléculas según sus propiedades moleculares como el tamaño y el grado de ionización. Posteriormente una parte de los productos que hemos separado mediante cromatografía se analiza para su identificación mediante espectrometría.

Tres estudios recientes han utilizado técnicas semejantes a las utilizadas en nuestro estudio para intentar identificar la presencia de beta-7-casomorfina en orina de sujetos con autismo. Hunter y colaboradores (2003) y Dettmer y colaboradores (2007) utilizaron espectrometría LC-MS/MS y Cass y colaboradores (2008) que utilizaron HPLC acoplada a MALDI-TOF MS. y tampoco obtiene resultados. Aun cuando las técnicas espectrométricas que se utilizan son diferentes, los resultados de los estudios de Hunter, Dettmer y

Cass son comparables. Ninguno de los trabajos en los que consiguen detectar beta-7-casomorfina en orinas contaminadas, consiguen detectar dicha molécula en orinas de sujetos con TEA (ver más adelante).

Detección de péptidos en orinas de pacientes con enfermedades neuropsiquiátricas

En 1971 Rimland estudió los patrones cromatográficos urinarios de 2218 niños con psicosis infantil con el fin de determinar si podían diferenciarse las patologías mentales en función de dichos patrones cromatográficos urinarios (255). A pesar de lo amplio de la muestra, los resultados de Rimland no fueron concluyentes, pero abrieron una línea de investigación que aún no se ha cerrado.

Muchos autores han estudiado las orinas de pacientes con enfermedades psiquiátricas con el fin de buscar sustancias biológicas y moléculas marcadoras de la etiopatogenia o de la gravedad o de la evolución de esta enfermedad (biomarcadores).

Con esta misma idea del trabajo de Rimland, Reichelt y colaboradores (1980) estudiaron los patrones cromatográficos urinarios de distintas enfermedades mentales: 5 pacientes con depresión; 7 pacientes con esquizofrenia; 20 niños con autismo; 9 niños con hiperactividad y 20 soldados sometidos a estrés por

un curso de combate. Estos autores definieron tres patrones cromatográficos peptídicos urinarios básicos: histeriforme, esquizoide e hipercinético, que suponían podían ayudar al diagnóstico diferencial de estos pacientes ya que interpretaron que estos resultados podían deberse a un problema metabólico específico, relacionado con las proteínas y su transporte orgánico (218). Un año más tarde y basándose en estos dos estudios, este mismo grupo estudió los patrones cromatográficos de péptidos en 13 pacientes con esquizofrenia y 25 niños con autismo, comparándolos con sujetos normales y concluyeron que dichos patrones cromatográficos anormales de autismo y esquizofrenia reflejaban excesiva peptiduria (256).

Estos autores postulaban que el exceso de neuropéptidos era un hecho fundamental en el desarrollo de las enfermedades psicóticas. Pensaban que la “sobreproducción” de péptidos podría conducir al “hiperfuncionamiento” de algunos sistemas neuronales y que este exceso de péptidos se eliminaría por la orina (256). Basándose en estos estudios, se inició el análisis de la orina de estos pacientes, en busca de los perfiles peptídicos cromatográficos concretos de enfermedades mentales como esquizofrenia y autismo.

Gilbert y colaboradores (1982) estudiaron los patrones cromatográficos urinarios de 24 niños con autismo y los compararon con los patrones de 12 niños con otros trastornos mentales infantiles: 5 niños con el llamado “síndrome de mínima disfunción mental”, 5 niños con déficit de atención y 14 niños con retraso mental. Compararon dichos grupos con 19 niños de desarrollo típico. Clasificaron los patrones cromatográficos resultantes en 6 grupos: 5 patrones

cromatográficos diferenciaban al 54 % de los niños con autismo y al 17% de los niños con otras psicosis, que mostraron patrones diferentes al patrón cromatográfico que consideraron normal y que a su vez aparecía en el 8% de los niños con autismo, el 95% de los niños sanos y el 93% de los niños con retraso mental sin psicosis (257).

Foss y colaboradores (1985) buscaron comparar los perfiles peptídicos cromatográficos urinarios en el síndrome de Rett con diferentes comportamientos. Observaron tres perfiles urinarios diferentes: 6 pacientes tenían perfiles como los observados en los controles normales y que coincidían con los pacientes más hábiles; el segundo perfil aparecía en 5 pacientes con comportamiento compulsivo y el tercer perfil en 9 pacientes que coincidían con la forma autista esquizoide y que era el grupo con síntomas más marcados (258).

Gilroy y colaboradores (1990) intentaron replicar la técnica cromatográfica en orina en 5 pacientes con esquizofrenia comparándolos con 4 controles normales pero no encontraron resultados significativos. Estos autores achacaron sus resultados a la complejidad y lentitud del método y a la gran cantidad de fuentes de variabilidad que podían confluir (260).

Reichelt y colaboradores (1995) con el fin de analizar la influencia de los tratamientos farmacológicos en dichos patrones cromatográficos, estudiaron 34 pacientes esquizofrénicos de entre 16 y 60 años, de los que 6 empezaron a tomar su medicación neuroléptica al inicio del estudio y otros 2 pacientes

disminuyeron las dosis de neuroléptico también en ese momento. En este estudio se observó peptiduria en los patrones cromatográficos urinarios, una disminución en dicha peptiduria cuando se introducía el tratamiento con neurolépticos y un aumento cuando se disminuían las dosis de neuroléptico (261).

Solaas y colaboradores (2002) estudiaron un grupo de 53 niñas con síndrome de Rett, clásico y congénito y los compararon con 53 niñas sanas. Encontraron que únicamente la mitad de las niñas con síndrome de Rett tenía peptiduria y que esta peptiduria era menor en los casos de síndrome de Rett clásico que en los de síndrome de Rett congénito (259).

Liu y colaboradores (2007) estudiaron a 36 pacientes con depresión de entre 23 y 60 años y diagnosticados según el ICD 10, que precisaron hospitalización y estuvieron más de 5 semanas sin medicación y los compararon con 217 personas sanas de entre 16 y 65 años. A pesar de que estos autores no pudieron clasificar las depresiones con los perfiles cromatográficos peptídicos urinarios, sí observaron peptidurias mayores en enfermos más graves y que los niveles de péptidos disminuían en los enfermos tratados con neurolépticos (262).

Desde los primeros estudios se presumía que el origen de esta peptiduria pudiera ser achacado a péptidos de origen endógeno, procedentes del sistema nervioso central; pero en 1996 Reichelt y colaboradores plantean la duda de que estos péptidos podían proceder de fuentes externas, basándose en los

trabajos de Dohan de la relación entre el gluten y la esquizofrenia y en los descubrimientos anteriores de la existencia de péptidos activos derivados de la digestión del gluten (264) y de la leche (265) (266). Reichelt propone que la peptiduria que se había encontrado en los estudios precedentes podría ser explicada por la hipótesis de Dohan respecto a la interacción entre la carga genética y la ingesta de proteínas dietéticas (267). Hipotetizaron que una ruptura enzimática incompleta intestinal de dichas proteínas pudiera provocar la liberación de dichos péptidos (268).

En este sentido Reichelt y Ek (1998,1999) buscaron dichos péptidos en las orinas de celíacos ya que este grupo de pacientes son susceptibles de presentar daño intestinal que pudiera justificar la entrada en el torrente sanguíneo de estos péptidos procedentes de la dieta. Tras observar que dichos patrones cromatográficos revelaban peptiduria, relacionaron dicho patrón de péptidos con la dieta, resultando que éste patrón peptídico urinario disminuía al instaurar la dieta libre de gluten.

En el primer estudio se incluyeron 19 niños de entre 2 y 14 años con enfermedad celíaca no tratada y se observó una peptiduria urinaria en los pacientes celíacos, comparado con los controles sanos pareados en sexo y edad. Dicha peptiduria disminuía un año después de seguir la dieta libre de gluten (269).

En el segundo estudio incluyeron a 18 niños celíacos de entre 2 y 15 años, durante un periodo de dos años, antes y después de haber estado a dieta libre

de gluten y se vio una disminución de los patrones peptídicos cromatográficos en las orinas de los pacientes con dieta (270). Puesto que en ambos estudios resultaba que los niños celíacos presentaban disminución de la peptiduria tras la dieta libre de gluten, estos autores concluyeron que dicha peptiduria pudiera ser debida a la absorción de los péptidos procedentes de la degradación de las proteínas de la dieta.

De la misma manera, en las orinas de otros sujetos con trastornos mentales se ha realizado la búsqueda de patrones cromatográficos peptídicos alterados y se ha pensado que la alteración de los patrones peptídicos pudiera estar relacionada con alteraciones en la absorción intestinal de proteínas derivadas de la dieta. Nygaard y colaboradores (2001) estudiaron 55 niños con Síndrome de Down de entre 5 y 9 años, de los que 6 estaban a dieta libre de gluten. Un grupo control se compuso de 44 hermanos sanos de entre 5 y 8 años y un segundo grupo control de 117 niños normales. Estudiaron los patrones cromatográficos urinarios y los niveles de IgG frente a gliadina y gluten e IgA frente a gliadina, gluten, alfa-lactoalbúmina, beta-lactoglobulina, caseína y ovoalbúmina e intentaron relacionar los patrones cromatográficos urinarios con los niveles de inmunoglobulinas frente a estas proteínas dietéticas. Los niños con Síndrome de Down no tuvieron niveles aumentados de péptidos respecto a sus hermanos sanos, pero ambos grupos presentaban niveles de peptiduria significativamente elevados respecto a controles sanos no hermanos. 31 de los 55 niños con síndrome de Down tenían niveles de inmunoglobulinas frente a proteínas alimentarias por encima de lo normal y de estos, sólo dos niños confirmaron un diagnóstico de celiaquía (271). De manera que este estudio no

fue concluyente de que hubiera una relación entre el Síndrome de Down, la peptiduria y la celiaquía.

Ninguno de los estudios descritos permite establecer relaciones causales entre los hallazgos observados y la enfermedad psiquiátrica. Una posible interpretación de los resultados positivos sería que los sujetos con una enfermedad están sometidos a una situación de estrés fisiológico que se acompaña de un estado proinflamatorio (como se ha mostrado en depresión o psicosis aguda) y ese propio estado proinflamatorio generalizado produciría, entre otros, un aumento de la permeabilidad intestinal, con la absorción subsecuente de péptidos no absorbidos en condiciones fisiológicas.

Peptiduria y proteínas dietéticas en los TEA

Con el fin de estudiar la utilidad de los patrones peptídicos urinarios como marcador de la patología autista, Israngkun y colaboradores (1986) estudiaron las orinas de 13 niños con autismo y los compararon con 10 controles sanos. Este grupo observó diferentes patrones cromatográficos en los que aparecía un gran pico común en casos y controles, mientras que aparecía un segundo pico exclusivo en pacientes con autismo (272).

Varios estudios valoraron la peptiduria y la compararon con la gravedad de la enfermedad. Le Couteur y colaboradores (1988) aplicaron esta misma técnica

para diferenciar los pacientes con TEA de la misma edad en función de su grado de gravedad. Realizaron un estudio ciego sobre jóvenes adultos y no fueron capaces de diferenciar a los niños de edades similares y distintos grados de alteraciones de aprendizaje (273). Alcorn y colaboradores (2004) repitieron este mismo estudio con 34 niños con TEA de entre 3 y 11 años, de los que habían excluido a aquellos que presentaban alguna causa médica conocida causante de la enfermedad, como síndrome de Down y síndrome X frágil. Clasificaron los grupos en dos: alteraciones de aprendizaje normal / media y alteraciones moderada / severa y observaron patrones cromatográficos con peptiduria anormal en las muestras procedentes del segundo grupo de alteraciones moderada / severa (274). En el año 2006 Reichelt y colaboradores (2006) estudiaron dichos patrones cromatográficos en niños con TEA de alto funcionamiento comparando con un grupo control de hermanos sanos y otro de controles sanos no hermanos y los resultados sólo mostraron patrones peptídicos anormales en el 17% de los niños con TEA (275). Por tanto, la gravedad de la sintomatología podría ser un factor asociado a la peptiduria, lo que apoyaría la hipótesis de que ésta fuera un epifenómeno de gravedad o situación de sintomatología aguda.

Se han estudiado los patrones cromatográficos de las orinas de pacientes con TEA y con síntomas gastrointestinales asociados. Con el fin de comparar dichos patrones peptídicos urinarios en niños con autismo con alteraciones gástricas y relacionarlos con la dieta libre de cereales y leche, Reichelt y colaboradores (1986) estudiaron las orinas de tres grupos de niños con TEA de instauración anterior a los 30 meses de edad: el primer grupo de 79 niños (3-18

años) con trastorno de desarrollo infantil, cuyos padres informaron que tenían una ingesta alterada de cereales y pan; el segundo grupo de 16 niños con criterios claros de autismo infantil sin ninguna relación aparente con la alimentación; el tercer grupo de 50 niños con autismo de alto funcionamiento, cuyos padres informaron durante la recogida de datos que habían notado alteraciones en su ingesta de leche. Estos tres grupos de niños mostraban peptiduria en sus patrones cromatográficos, con picos que se presentaban a distinto volumen de elución y se detectaban a 280 nm. Reichelt y colaboradores interpretaron que se trataba de eluciones de distintos compuestos aromáticos de origen endógeno causadas por alteraciones relacionadas con la alimentación (276).

En posteriores estudios de este mismo grupo de investigadores, se tomaron en cuenta los patrones cromatográficos urinarios como base para establecer un tratamiento dietético que excluyera el gluten y la caseína de la dieta como probables precursores de estos péptidos urinarios encontrados en los picos cromatográficos (269) (277). En el año 2002 Reichelt y colaboradores incluyeron 20 niños con autismo con patrones peptídicos urinarios alterados, con un seguimiento de 86 a 90 meses y los dividieron en dos grupos a uno de los cuales pusieron a dieta libre de gluten y caseína. Evaluaron los síntomas y el comportamiento autista antes y después del estudio. Los rasgos autistas, nivel cognitivo, lenguaje y síntomas motores se obtuvieron mediante observaciones estandarizadas (Haracopos y Kelstrup, 1975) y diversos test (Gjessing y col, 1975; Leiter, 1979; Hagtvet y Lillestølen, 1985; Henderson y Sugden, 1992). Se observaron cambios en ambos grupos, pero estos fueron

más marcados en los niños que estaban a dieta libre de gluten y caseína (221).

Whiteley y colaboradores (2010) estudiaron 55 niños con TEA y péptidos urinarios anormales y los dividieron en dos grupos: 26 a los que sometieron a dieta libre de gluten y caseína y 29 sin dieta restrictiva, durante 1 año. Midieron los síntomas autistas y las capacidades mediante la Escala de Observación para el diagnóstico de Autismo (Autism Diagnostic Observation Schedule, ADOS), la escala de comportamiento adaptativo Vineland (Vineland Adaptive Behavior Scale, VABS), la Escala de Valoración de Déficit de Atención e Hiperactividad IV (Attention Deficit Hyperactivity Disorder Rating Scale IV, ADHD-IV) y la Escala de Evaluación de Autismo de Gillian (Gillian Autism Rating Scale), haciendo un seguimiento de hasta 24 meses. Todos los participantes que siguieron la dieta mostraron una importante mejoría en todas las escalas, aunque de manera aislada mostraron alteraciones comportamentales durante la instauración de la dieta y en los estadios tempranos. Se observaron mejorías significativas en los comportamientos y síntomas autistas, especialmente desde el mes 8 de seguimiento de la dieta (224). A pesar de los resultados y de la mejoría de algunos grupos, las comparaciones se hicieron inter- e intragrupos pudiendo dichos resultados ser indicativos del efecto de la intervención, además de que en ausencia de controles en este estudio no se puede atribuir al cambio de la dieta el efecto sobre el comportamiento. Se necesitan más estudios para determinar el potencial de la intervención y el grupo de individuos susceptibles de mejorar con dicha intervención.

Limitaciones de las técnicas cromatográficas en la identificación de sustancias de las orinas de sujetos con patología neuropsiquiátrica

En la determinación de la peptiduria todos estos estudios utilizaron columna cromatográfica de Sephadex 25 o columna C18 en fase reversa y las eluciones se sometieron a detectores de 215 nm y a 280 nm. Aun cuando estos estudios arrojaban datos sobre peptiduria en las orinas de estos niños, estas técnicas no permitían la identificación de dichos compuestos como ya hemos explicado en la discusión de la puesta a punto de la técnica. De modo que estudios posteriores han intentado identificar los compuestos responsables de dicha peptiduria mediante técnicas espectrométricas que permiten la identificación concreta de los compuestos presentes en dichas orinas.

Hunter y colaboradores (2003) con el fin de identificar los péptidos que comprendían estos patrones cromatográficos, analizaron las orinas de niños con autismo por técnicas cromatográficas asociadas a técnicas espectrométricas y se analizaron las muestras mediante espectrometría LC-MS/MS (Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometric). Estudiaron 10 niños con TEA de entre 2 y 10 años, comparándolos con sus hermanos sanos pero no se confirmó que los péptidos opioides estuvieran presentes en las orinas de los niños con TEA ya que no consiguieron desarrollar la técnica (89).

Dettmer y colaboradores (2007) intentaron nuevamente identificar estos péptidos que aparecían en los patrones cromatográficos. Tomaron la primera

orina de la mañana de 54 niños de entre 2 y 6 años, con diagnóstico de autismo mediante ADI-R y ADOS y 15 sujetos pareados en edad. Las orinas se conservaron a -20 °C hasta el análisis. No obtuvieron resultados con la técnica de LC-MS/MS en las orinas de los niños con autismo, aunque como ya hemos comentado se consiguió recuperar la beta-7-casomorfina en solución acuosa patrón contaminada y en orinas patrones en una concentración de 250 ng/ml (278). Estos autores llegan a la conclusión de que pudiera ser que hubiera beta-7-casomorfina en las orinas de los sujetos con TEA, pero de estar estos péptidos se encontrarían en concentraciones inferiores a 250 ng/ml, de modo que no serían detectables en el desarrollo de la técnica.

En el estudio de Cass y colaboradores (2008) se analizaron las orinas de pacientes con TEA en busca de péptidos opioides endógenos o exógenos por cromatografía de alta presión (HPLC) y Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). Para este estudio se reclutaron 65 niños con TEA, 58 con autismo y 7 con Asperger de entre 4 y 11 años, de los que 3 estaban a dieta libre de gluten y otros 3 a dieta libre de gluten y caseína. Se compararon con 158 controles de entre 4 y 12 años sin enfermedades neuropsiquiátricas. Se recogieron las primeras orinas de la mañana y se congelaron a -70 °C hasta el momento del análisis. No hubo diferencias significativas entre los niños con autismo y los niños con desarrollo típico en los perfiles urinarios de péptidos. Además, en aquellos casos en que el HPLC detectó picos en las zonas en que se supone deberían estar los péptidos opioides, el MALDI-TOF estableció que estos picos no correspondían a dichos péptidos (279). Aun cuando estos autores establecieron una

sensibilidad de la técnica de 0,75 microg/ml (750 ng/ml) en la detección de la beta-7-casomorfina en las orinas patrones, los autores de este trabajo concluyen de forma categórica que los péptidos opioides no pueden ser utilizados como biomarcadores de autismo ni como marcadores de respuesta a dietas libres de gluten y caseína.

En el año 2007 Liu y colaboradores habían utilizado la espectrometría acoplada a las técnicas cromatográficas para estudiar las peptidurias de pacientes con otra enfermedad mental (depresión). Tras los análisis urinarios cromatográficos, analizaron las orinas mediante espectrometría LC-MS/MS. Los resultados obtenidos fueron comparados con los resultados derivados de contaminar con glicimorfina y casomorfinas estándar. Estos autores obtuvieron datos de la masa de los péptidos mediante la espectrometría, pero no hicieron fragmentación, de modo que, aunque encontraron una compatibilidad de masas moleculares con respecto a los péptidos estándar, tampoco llegaron a realizar una identificación completa de dichos péptidos (262).

Los dos únicos estudios que analizan las orinas de pacientes con autismo mediante técnicas espectrométricas con el fin de identificar la beta-7-casomorfina son por tanto los de Dettmer (2007) y Cass (2008) anteriormente citados. En ambos estudios no se tuvo en cuenta la patología gastrointestinal de los sujetos, ni diferencias clínicas importantes como el nivel de discapacidad.

Patología gastrointestinal en los TEA

Se han descrito muchas enfermedades sistémicas asociadas de forma específica (con relación causal) o inespecífica, al autismo. Dentro de los trastornos específicos estarían aquellos de etiología conocida cuya fisiopatología puede explicar la aparición del autismo, como la fenilcetonuria, el síndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLOS) o el hipotiroidismo congénito.

En la valoración de la patología física uno de los síntomas de derivación a consulta y previos a considerar son el malestar físico y el dolor. Se ha visto que los niños con TEA tienen reacciones sensoriales anormales y una relación con el dolor diferente a los niños con desarrollo típico (286). Además, es posible que muchos individuos con TEA que son no verbales o tienen un mínimo lenguaje, no puedan expresar dolor o malestar (287). Realmente, no se sabe muy bien si la falta de expresión de la sensación del dolor que a veces se observa en estos niños es sólo un problema comunicativo o refleja una incapacidad de identificación de la propia sensación de dolor. Se ha observado que al producir estímulos de dolor en niños con TEA, estos no manifiestan variaciones en la expresión facial (288). Sin embargo se ha observado que la aparente disminución de la reactividad al dolor observada en los TEA no parece derivar de una analgesia real, sino de un modo diferente de expresión del dolor relacionada con las dificultades de la expresión verbal, representación corporal y ciertas alteraciones cognitivas (aprendizaje, representación de emociones y sensaciones, establecimiento causa-efecto) (289).

Tampoco hay consenso sobre si la falta de expresión de dolor se debe a un diferente umbral en su percepción; menor o mayor. En un estudio reciente, se ha visto que los niños con TEA tienen la misma sensibilidad que otros niños para detectar sensaciones placenteras como caricias suaves sobre la piel, sensaciones suaves de frío y calor y texturas agradables y que presentan un aumento de la sensibilidad a determinados estímulos como la vibración y las temperaturas extremas (290).

En todo caso, dado lo restrictivo de su capacidad de expresar estados emocionales y sensaciones de bienestar o malestar, los niños con TEA podrían manifestar la sensación de dolor de una manera atípica, como irritabilidad, oposicionismo, heteroagresividad, etc. Estos problemas pueden ser más evidentes en niños con dificultades graves en la comunicación verbal (63). Muchos de los padres de niños con TEA no verbal refieren síntomas de irritabilidad súbita manifestada como llanto inexplicado y agresividad o alteraciones en los patrones del sueño que se ha interpretado que pudiera tener que ver con síntomas físicos como dolor (65).

Los problemas de comportamiento de los TEA generalmente son recurrentes e interfieren con el funcionamiento del individuo y afectan a las familias y los miembros de la comunidad. Estos problemas de comportamiento, para algunos autores, son el factor más importante para determinar la calidad de vida de los individuos con TEA. En aproximadamente la tercera parte de los pacientes con TEA y cambios comportamentales, los psicólogos, educadores o familiares interpretan estos comportamientos como una afectación por situaciones de

estrés o de frustración, estrés familiar, edad y determinadas dificultades de comportamiento en el día a día (64). Sin embargo, debido a la falta de comunicación y de capacidad para dar muestras de la presencia de sintomatología, algunos autores plantean que en estos casos de alteraciones del comportamiento, la evaluación médica de estos niños debe formar parte de todo protocolo de evaluación (48) y cuando hay cambios comportamentales se debería descartar patología medica asociada a dolor (291).

Algunos autores han desarrollado un método secuencial de asesoramiento basado en estrategias de medida retrospectiva y prospectiva, relacionando la frecuencia e intensidad de los problemas de comportamiento con los días de dolor. Los resultados muestran que a mayor nivel de dolor, mayor frecuencia e intensidad del problema de comportamiento (292). Sin embargo, este método de evaluación se basa en hacer encuestas a los cuidadores, padres y profesores para que sean estos los que valoren la sensación de dolor en los niños. Parece raro que si los propios niños no tienen claras sus sensaciones y las personas que les rodean no saben si los problemas de comportamiento son debidos al dolor o no, puedan ser los padres y cuidadores los que valoren una sensación tan personal que supone un síntoma subjetivo que además va a ser de utilidad diagnóstica.

Algunos autores han asociado las alteraciones de humor y del sueño (51) (66), la irritabilidad, ansiedad y alteraciones sociales (67) o los síntomas autistas propiamente dichos con patología gastrointestinal (68) (69). Incluso algunos de estos autores sostienen que el tratamiento de los síntomas gastrointestinales

en niños con TEA con síntomas digestivos, podría tener efectos positivos sobre el comportamiento (69).

Nikolov y colaboradores (2009) estudiaron 172 niños con TEA y vieron que 39 de estos niños (22,7%) tenían síntomas gastrointestinales variados y que estos niños eran más irritables y tenían más ansiedad y peores comportamientos sociales, comparando con otros niños con TEA sin síntomas gastrointestinales (67). Adams y colaboradores (2011) estudiaron 58 niños con TEA y comprobaron que los niños con peores síntomas gastrointestinales eran aquellos con peores comportamientos autistas (293). Jyonouchi y colaboradores (2011) estudiaron a 30 niños con TEA que presentaban síntomas comportamentales fluctuantes y alergia alimentaria, con y sin síntomas gastrointestinales y relacionaron el grupo de más síntomas gastrointestinales con peores comportamientos autistas (294). También se ha relacionado la presencia de patología digestiva funcional con alteraciones del comportamiento y de los patrones de sueño en los TEA (295) (51) (296).

La mayoría de los trabajos que estudian la patología gastrointestinal en los TEA reportan una mayor incidencia de esta patología en este grupo de individuos (50) (49) (297) (58) que en controles. Wier y colaboradores (2006) compararon 417 niños, que fueron diagnosticados de TEA posteriormente, con 2.067 controles que se desarrollaron de forma típica y sin diagnóstico de TEA e informaron que las anomalías congénitas estructurales más frecuentemente encontradas en niños con TEA en comparación con niños sanos, estaban relacionadas con el sistema gastrointestinal (297). En un estudio de Xue y

colaboradores (2008) en el que se caracterizaron las concurrencias clínicas y subgrupos potenciales de autismo en 160 niños con TEA del Centro de Autismo de Nueva Jersey entre 1999 y 2003, se mostró una alta prevalencia de concurrencias múltiples médicas en los TEA frente a controles, destacando entre ellos los problemas de disfunción intestinal (296). Sin embargo, esto no ha podido ser contrastado por otros autores, que al comparar los síntomas digestivos de los TEA con los de otros trastornos de desarrollo, no han encontrado diferencias claras salvo por la selectividad alimentaria que observaron específicamente en este grupo (54).

Según la revisión de Buie y colaboradores (2010) los datos publicados de cifras de rango de prevalencia de síntomas gastrointestinales en los TEA son muy amplios y se extienden desde un 9 a un 70% (48). Los síntomas gastrointestinales más comunes y manifestados por personas con TEA son: estreñimiento crónico, dolor abdominal con o sin diarrea, encopresis como consecuencia del estreñimiento, reflujo gastroesofágico, gases, deficiencias en las disacaridasas, inflamación del tracto gastrointestinal y anomalías en el sistema nervioso entérico (48).

Valicenti-McDermott (2006) mediante una entrevista estructurada, compararon las alteraciones gastrointestinales en 50 niños con TEA frente a 50 niños con otras alteraciones del desarrollo y 50 niños de desarrollo típico. Un 70% de los niños con TEA tenían historial de síntomas gastrointestinales, frente a un 40% de los niños con otras alteraciones del desarrollo, siendo las alteraciones encontradas más significativas las de la consistencia de las heces y la

selectividad alimentaria (49). De Magistris y colaboradores (2010) estudiaron las alteraciones gastrointestinales de los TEA comparándolas con sus consanguíneos de primer grado y otro grupo no relacionado y de desarrollo típico. Encontraron alteraciones gastrointestinales en los TEA en el 46,7% (45,5% estreñimiento, 34,1% diarrea y 15,9% otros síntomas). Estos autores midieron también la permeabilidad intestinal y observaron un aumento en el 36,7% en los TEA y en sus consanguíneos en el 21,2%, mientras que en los sujetos control de desarrollo típico solo encontraron un 4,8% (50).

De forma aislada, algunos autores han visto alteraciones en las enzimas digestivas en los niños con TEA. Una baja actividad de enzimas intestinales disacaridasas (51), bajas concentraciones de alfa-1-antitripsina hepática (52) y una menor capacidad de sulfatación hepática (53) (51).

Entre las alteraciones de las heces que muchos de los trabajos describen están las que afectan a la consistencia como diarrea y/o estreñimiento (54) (55) (56), diarrea (57) (58), estreñimiento (58) (59) (60) (61), alteraciones en el color, heces sanguinolentas, flatulencia (54) (55) y heces voluminosas y olorosas (57).

Wang y colaboradores (2011) hicieron un estudio retrospectivo de historias clínicas médicas de familias con múltiples miembros afectados por TEA mediante entrevistas realizadas por un neuropediatra a los padres, con 589 afectados con TEA, comparados con 163 hermanos no afectados. Los padres informaron de problemas gastrointestinales en el 42% de los sujetos (249/589)

y en el 12% de los no afectados (20/163), siendo los problemas gastrointestinales más frecuentemente encontrados el estreñimiento en el 20% de los casos (116/589) y diarrea crónica en el 19% (111/589). En este trabajo se observó además que la gravedad de los síntomas autistas estaba asociada a peores síntomas gastrointestinales (56).

Esto es confirmado por otros estudios. Valicenti-McDermott y colaboradores (2006) realizaron un estudio comparando los síntomas gastrointestinales en 50 niños con TEA y 50 niños sanos pareados y otros 50 niños con otras alteraciones del desarrollo. Observaron alteraciones en la consistencia de las heces en el 18% de los niños con TEA frente al 4% de desarrollo típico y en el 2% de los niños con otras alteraciones del desarrollo, aunque no se vieron alteraciones en la frecuencia diaria de las deposiciones (49). Estas diferencias en la consistencia de las heces se hacen más patentes cuando se analizan los datos en niños con TEA a partir de los 30 meses de edad (55).

Con el fin de dilucidar si las alteraciones en la consistencia de las heces estaban relacionadas con la alimentación, Levy y colaboradores (2007) recogieron los datos de la ingesta diaria de 62 niños con TEA de entre 3 y 8 años y se correlacionó con la consistencia de las heces usando un método de regresión logística con acoplamiento entre variables y llegaron a la conclusión de que el 54% de los niños con TEA tenían alteraciones en la consistencia de las heces (62), sin observarse una relación estadísticamente significativa entre la ingesta y la consistencia de las heces (62). En otro estudio el consumo de leche se ha descrito como predictivo de estreñimiento en el grupo con autismo,

pero no de la frecuencia de heces, suciedad ni dolor abdominal (61).

Se ha pensado que las alteraciones digestivas podrían estar causadas por alteraciones en la flora intestinal, alergias alimentarias o alteraciones inmunológicas con afectación del sistema digestivo.

Algunos estudios sugieren que los niños con TEA tienen alteraciones en la flora intestinal, al comparar con los niños de desarrollo típico. En los TEA se han visto alteraciones en la flora intestinal en comparación con niños control de hasta 10 veces mayor en los sujetos con TEA (70) (71), con un mayor porcentaje del género “Clostridium” (72) (73) (74) (75) (76) y una mayor variedad en las especies de este género (73). Un estudio reveló que estaban aumentados concretamente tres grupos de “Clostridium” diferentes: el “Clostridium bolteae” y los clúster de “Clostridium” I y XI, en individuos con TEA (74).

También se han investigado los fenotipos metabólicos en orina de pacientes con TEA, fenotipos que pueden verse influidos por los perfiles de poblaciones de la flora intestinal. Yap y colaboradores (2010) han descrito en los TEA diferencias en las excreciones urinarias de aminoácidos y metabolitos microbianos (77). También se han detectado metabolitos de la microflora intestinal derivados de determinados aminoácidos como la tirosina, que producen p-cresol, que se han visto elevados en niños menores de 8 años y en niñas con TEA (78). También en los trabajos de Shaw (2010) se ha visto en los TEA y no en los controles un metabolito de m-tirosina-hidroxifenilalanina que se

piensa específico del “Clostridium genus” (79).

La hipótesis de que en los TEA existe una alteración en el balance de la flora intestinal, con la presencia de toxinas producidas por especies de “Clostridium”, que pudiera contribuir a los síntomas comportamentales, se refleja en un estudio de 11 niños con diarrea crónica y autismo regresivo (80). Los casos fueron tratados durante 8 semanas con vancomicina, un medicamento que se utiliza en el tratamiento de la diarrea crónica por “Clostridium difficile”. Los síntomas de comportamiento y comunicación mejoraron significativamente durante el periodo de tratamiento, pero los efectos fueron temporales y se perdieron en la mayoría de los casos al terminar el tratamiento. Sin embargo, en este estudio no se refleja la sintomatología gastrointestinal ni la composición de la flora fecal y no había grupo control en el diseño experimental.

En segundo lugar, en relación a que la posible causa de las alteraciones digestivas en los TEA pudieran ser las alergias alimentarias y en base a observaciones clínicas y parte de los hallazgos apuntados y junto con la observación de una relación entre dieta y alteraciones de comportamiento, algunos investigadores han trabajado en estudios cuyo objetivo era dilucidar la posibilidad de que los síntomas comportamentales pudieran verse afectados por manipulaciones de la dieta.

En un estudio de Gurney y colaboradores (2006) con datos tomados de un registro nacional de salud infantil, los padres de niños con TEA (n=483) informaron de más síntomas de alergia, especialmente alergias alimentarias,

que en los niños sanos (n=84789) (298).

En algunos grupos de sujetos con TEA en que se ha sospechado la posibilidad de alergias alimentarias, no se han detectado niveles de IgE frente a alimentos que avalaran esta hipótesis (115). Algunos autores han hipotetizado que dichas alergias pudieran no estar mediadas por IgE (81) (82) y en varios estudios en niños con TEA se han visto aumentados los niveles de IgG4, inmunoglobulina relacionada con la hipersensibilidad alimentaria (83) (84) (85); en estos mismos estudios los aumentos en los niveles de dicha inmunoglobulina han sido asociados a peores comportamientos autistas.

En relación a las inmunoglobulinas y a las alergias alimentarias, hasta hace bien poco se pensaba que los niveles altos de IgG4 podían ser indicativos de intolerancias alimentarias más o menos patológicas o de determinados síntomas relacionados con la ingesta alimentaria. Hasta mediados de los años 90 se pensaba que las alergias alimentarias podrían tener dos mecanismos diferentes mediados por IgE y por IgG4. En 1995 la Academia Americana de Alergia publicó un documento de posicionamiento al respecto explicando que el análisis de los niveles de IgG4 como herramienta de diagnóstico y pronóstico para las enfermedades alérgicas no estaba claro, debido a que determinados estudios habían sembrado dudas sobre la posible función de esta inmunoglobulina como protector o como efector en la respuesta alérgica (116). En el año 2008 la Academia Europea de Alergia también se posicionó sobre la idea de que la medida de los niveles séricos de IgG4 no son indicativos de alergia alimentaria ni intolerancia, manifestando que muchas muestras séricas

dan resultados positivos de IgG4 sin los síntomas clínicos correspondientes. Esto unido a la falta de evidencia de las propiedades de la IgG4 en la liberación de histamina en humanos y a la falta de estudios controlados sobre el valor diagnóstico de la IgG4 en los test de alergia alimentaria, hace que no se deba considerar que la IgG4 específica frente a alimentos tenga un papel efector en la hipersensibilidad alimentaria. La Academia Europea de Alergia concluye que la IgG4 específica frente a alimentos no indica alergia alimentaria o intolerancia inminente, sino más bien una respuesta fisiológica del sistema inmune después de la exposición a los componentes alimentarios y considera que el test de la IgG4 frente a alimentos es irrelevante como indicador de la intolerancia alimentaria o alergia alimentaria (117).

Las alergias alimentarias quedan así definidas por el aumento en los niveles de IgE. El concepto de que los aumentos de los niveles de IgG4 sea indicativo de intolerancias a determinados alimentos no está aceptado por las Academias Europea ni Americana de la Alergia y estas instituciones mantienen que los aumentos de dichas inmunoglobulinas son debidas a fenómenos de tolerancia más que de alergias alimentarias.

Pasamos a valorar el tercer punto que pudiera ser causa de la alteración gastrointestinal de los TEA. Las alteraciones inmunológicas con afectación de la mucosa digestiva en los TEA. Con el fin de facilitar la lectura, en el anexo 3 y a modo de glosario, se han descrito los parámetros inmunes a los que nos referimos en estos apartados.

Sistema inmune en los TEA

Se sabe que el autismo es un trastorno del neurodesarrollo, con múltiples causas y mecanismos fisiopatológicos implicados, donde órganos y sistemas distintos del sistema nervioso central pueden también estar involucrados y cuya afectación puede ser diferente en distintos casos. Aunque inicialmente fueron observaciones clínicas y epidemiológicas las que hicieron sospechar sobre el posible papel de una alteración inmune en la génesis de los TEA, en numerosos estudios en diferentes muestras biológicas han sido descritas alteraciones en la función inmune tanto en niños como en adultos con TEA; entre ellos, se incluyen alteraciones en la función inmune celular sistémica, niveles altos de perfiles de citoquinas proinflamatorias en líquido cefalorraquídeo y sangre, evidencia de inflamación en muestras de tejido cerebral y aumento de autoanticuerpos específicos frente al tejido cerebral como detallaremos más adelante.

La evidencia de que existen alteraciones inmunes en los TEA parece cada vez más clara; sin poder concretar exactamente cuáles son los mecanismos afectados para que esto ocurra. Tampoco está aún claro si las alteraciones inmunológicas encontradas responden a mecanismos inespecíficos de enfermedad o por el contrario son hallazgos con una cierta especificidad respecto a la patología autista.

Se han asociado alteraciones en determinados parámetros inmunes más

específicamente con los comportamientos propios de los TEA, fundamentalmente relacionados con el déficit en la interacción social y la comunicación. Esto sugiere una cierta relación entre la patología inmunológica observada y el proceso que lleva a la presentación de síntomas autistas. En la tabla 5.8 se resumen algunos de estos trabajos.

Se han revisado los trabajos que estudian los parámetros inmunes sanguíneos en los TEA. Algunos autores han estudiado los niveles de poblaciones leucocitarias y su CD (Cluster Differentiation) (86) (87) (88) (89) (90) (91) (92) (93) (94). Otros autores han estudiado la respuesta leucocitaria respecto a la capacidad mitógena y a la expresión de CD leucocitarios frente a determinados estimulantes leucocitarios específicos, como fitohemaglutinina, toxoide tetánico y mitógenos (86) (95) (88) (96). Respecto a los perfiles de citoquinas, varios estudios han valorado los niveles de citoquinas y de otros mediadores inmunológicos de naturaleza molecular presentes en muestras sanguíneas de sujetos con TEA (97) (98) (99) (100) (101) (102) (103) (104) (105) (91) (106) (107) (108) (109) (110) (111) (112). Por último, algunos autores han valorado la respuesta inmune frente a estimulantes como lipopolisacáridos (LPS), enterotoxina B de *Staphilococo* anti CD28, fitohemaglutinina (PHA), toxoide tetánico, antígeno estimulante, línea monocitaria como estimulante, ácido lipoteicoico (LTA), estimulante de TLR5 y polvo de casa, analizando las variaciones en la producción de citoquinas por parte de las poblaciones de células inmunes (100) (113) (102) (91) (114) (96). Por su importancia en las conclusiones, se han reflejado en una tabla los niveles de citoquinas sanguíneas y las diferencias frente a controles en el Anexo 3.

Tabla 5.8. Relación entre las alteraciones en parámetros en los TEA y alteraciones de comportamiento.

Autor Año	Escala	Resultados en las variables inmunológicas en sujetos con TEA frente a controles	Relación entre la alteración inmune y los síntomas comportamentales
Denney 1996 (88)	ABC	Menor LT CD4, menor expresión IL2R en Linfocitos tras estimulación con PHA	Peores síntomas de los TEA
Croonenberghs 202 (101)	YSR	Mayor nivel de proteína sérica total y gamma-globulina	Peores síntomas sociales
Hranilovic 2007 (143)	CARS	Niveles altos de serotonina plaquetaria	Menor desarrollo del lenguaje
Heuer 2008 (144)	ABC	Menores niveles de IgG e IgM	Peores síntomas
Grigorenko 2008 (145)	ADOS	Mayores niveles plasmáticos de MIF	Peores habilidades sociales e imaginativas
Ashwood 2008 (146)	ADOS ABC MSEL	Menores niveles de TGB-beta-1	Peores puntuaciones ABC y peor comportamiento adaptativo VABS
Iwata 2008 (147)	ADI-R	Menores niveles de selectina P y L	Peores síntomas sociales
Mostafa 2008 (105)	CARS	Niveles altos de serotonina plaquetaria Más manifestaciones alérgicas	Peores puntuaciones comportamentales
Onore 2009 (148)	ADOS	Tendencia a menores niveles de IL-23	Menor interacción social
Enstrom 2009 (83)	ADOS	Mayores niveles de IgG4	Síntomas autistas más graves
Mostafa 2009 (120)	CARS SBT	Mayor frecuencia de anticuerpos antinucleares	Más comportamientos autolesivos y retraso mental
Ashwood 2010 (92)	ADI-R, ADOS, SCQ, VABS, MSEL, ABC	Alteración en las respuestas de citoquinas frente a PHA y LPS	Alteraciones del comportamiento según Th1 o Th2
Enstrom 2010 (114)	ADI-R	Mayor producción de IL-1-beta al estimular linfocitos con LPS y de IL-6 al estimular los monocitos con LTA	Peores síntomas de la comunicación y sociales
Goines 2010 (149)	ADI-R, ADOS, SCQ, VABS, MSEL, ABC	Anticuerpos frente a proteínas del cerebelo	Anticuerpos relacionados con peores comportamientos
Kajizuka 2010 (150)	ADI-R	PDGF-BB	Niveles mayores relacionados con peores puntuaciones
Kolevzon 2010 (107)	ADI-R	Niveles altos de serotonina sanguínea	Relacionados con los comportamientos autolesivos
Al-ayadhi 2011 (110)	CARS	Mayores niveles de osteopontina	Relación positiva con la gravedad de los síntomas
Ashwood 2011 (151)	ADOS ADI-R	Mayores niveles de TNF-alfa, GM-CSF, IL-12p40, IL-13, IL-5, mayor respuesta proliferativa de neutrófilos.	Más esterotipias, alteraciones sociales, letargia, alteraciones lenguaje, hiperactividad, síntomas motores.
Goines 2011 (152)	ADOS ADI-R ABC MSEL VABS	Mayores niveles de autoanticuerpos anticerebelo	A mayores niveles, peores síntomas de los TEA.
Mostafa 2011 (142)	CARS	Niveles de serotonina altos	Mayor gravedad de los síntomas
Mostafa 2011 (121)	CARS	Mayores niveles de neuroquinina A y anticuerpos antiribosomales P	Mayor gravedad de los síntomas
Mostafa 2011 (139)	CARS	Niveles de autoanticuerpos antigangliósidos M1	Mayor gravedad de los síntomas
Suzuki 2011 (108)	ADI-R	Perfiles de citoquinas	Relación entre mayores niveles de IL-1-beta, IL-1 y IL-1-RA con peores síntomas
Mostafa 2012 (138)	CARS	Niveles de anticuerpos séricos antineuronales	Mayor gravedad de los síntomas

El sistema inmune es un sistema complejo donde múltiples mecanismos ocurren simultáneamente e intervienen variedad de moléculas intermediarias y proteínas de expresión.

En condiciones naturales, la respuesta inmune está orquestada inicialmente de una manera secuencial, generando estímulos inmunes que desencadenan una auténtica red inmunológica en la que conviven mecanismos de estimulación con mecanismos de compensación. Por otro lado la respuesta inmune no se desencadena con un único estímulo, sino que varios estímulos pueden confluir simultáneamente en un organismo, provocando una respuesta inmune donde intervienen múltiples factores de forma simultánea.

La respuesta inmune se produce en dos fases, la innata y la adaptativa. La respuesta innata es la respuesta inmediata que se produce ante los primeros estímulos inmunes y supone la defensa inicial, mientras que la respuesta inmune adaptativa es aquella que se produce en una segunda fase, que supone una especialización, y se produce en respuesta a un estímulo concreto frente al que el sistema inmune ya tuvo un primer contacto. En la primera fase innata se reconoce el antígeno mediante las células presentadoras de antígeno y se prepara la respuesta específica frente a ese antígeno, que se va a desarrollar en la segunda fase orquestada por los linfocitos T y B. Ambas fases se solapan a través de los linfocitos T, encargados de coordinarlas. Cuando actúan las células presentadoras de antígeno y los linfocitos T se va a producir una respuesta llamada “proinflamatoria”, cuyo fin va a ser desplegar todos los

mecanismos necesarios para que la respuesta inmune cumpla su función y tras ello será reequilibrada mediante una serie de mecanismos, los compensadores.

Dependiendo de que el tipo de estímulo inmune sea celular o molecular, las células presentadoras de antígeno producirán unas citoquinas concretas que van a decantar la respuesta inmune hacia una respuesta linfocitaria Th1 o Th2. Cuando el estímulo inmune es de tipo celular, la línea monocitaria estimula una respuesta de tipo Th1 y si es de tipo molecular será Th2. Los linfocitos Th2 a su vez van a estimular la línea de linfocitos B, productores de anticuerpos específicos.

Tras la respuesta inmune inicial se disparan los mecanismos compensadores entre los que están las moléculas y linfocitos reguladores y otros mecanismos diferentes, como por ejemplo que ambas poblaciones de linfocitos Th1 y Th2 a su vez se compensan mutuamente.

Raramente se ha estudiado el sistema inmune en su conjunto en los sujetos con TEA; en general, cada estudio ha investigado un aspecto parcial y con un planteamiento concreto. Además, los trabajos que se han hecho sobre sistema inmune y TEA presentan muy distintos enfoques y metodologías. Por tanto, se hace difícil comparar y sintetizar todos estos estudios de una forma clara y con detalle, llegando así a una conclusión que compendie todos los hallazgos que se han reportado en relación a este tema y poder analizar la posible patología inmune en los TEA. Por otro lado cuando estudiamos de una manera transversal los parámetros inmunes nos encontramos con toda la red inmune

desplegada y es muy difícil determinar qué estímulo o estímulos concretos han determinado la presencia de cada parámetro inmune concreto.

Tomando todos los resultados de los estudios inmunológicos que se han realizado en los sujetos con TEA y comparándolos, se observan grandes diferencias, muchas veces contradictorias y se hace difícil una valoración conjunta. Las causas de dichas diferencias pueden ser muy diversas. Los tamaños de las muestras, a veces pequeñas, dan lugar a muchos errores tipo II, las edades de los sujetos reclutados son muy variables (lo cual puede ser determinante en el caso de las alteraciones inmunológicas en los TEA), la selección de las muestras en función de diferentes criterios, la selección de los controles, los diferentes criterios de pareado entre casos y controles o la falta de paridad en aspectos fundamentales (como la edad, por ejemplo, o el momento de la enfermedad) pueden condicionar gran parte de la variabilidad de los resultados. Todo esto lleva a la presencia de resultados no comparables y puede conducir a errores en la interpretación.

Respecto a las técnicas, hay que tener en cuenta, entre otros, la amplia franja temporal de estos estudios, con la capacidad tecnológica de cada época, la selección de la muestra que se va a utilizar como suero, plasma, sangre total o sangre tratada para obtener determinadas porciones, etc., o el tratamiento analítico que se le da a las propias muestras, las distintas concentraciones usadas de los estimulantes mitógenos, los distintos tiempos de la duración de la estimulación o el uso de inhibidores de procesos concretos. También las condiciones o los tiempos de incubación de las estimulaciones inmunitarias

pueden provocar diferencias de respuesta específicas con cada uno de los estimulantes. Por ejemplo, la disminución en las respuestas al utilizar toxoide tetánico puede deberse a anomalías en las células presentadoras de antígeno, puesto que el toxoide tetánico es primero fagocitado o picnocitado antes de que pueda ser presentado y detectado por células T, de modo que si la captación o presentación del antígeno estuviera alterado en los TEA podríamos tener una disminución en la respuesta proliferativa linfocitaria que se reflejaría en los resultados y que podría ser malinterpretado. De la misma manera, la fitohemaglutinina produce una estimulación más directa y no necesita pasar por las células presentadoras de antígeno, de modo que si hubiese una alteración en esta fase de la respuesta inmune, esto podría pasar desapercibido o conducir a conclusiones erróneas. Además, el uso de determinados marcadores en presencia de estimulación puede conllevar a errores. Por ejemplo, después de estimulación las células T producen y reciben la IL-2 necesaria para su proliferación. La expresión del CD25 (cadena alfa del IL-2R) de las células T puede ser usado como un marcador de la activación, puesto que normalmente no se expresa en células activadas, pero sí cuando la célula es estimulada. Sin embargo, este marcador también se encuentra en linfocitos T CD25 reguladores, de modo que si hubiese alteraciones en los niveles de los linfocitos T reguladores, podría dar lugar a un error en la interpretación de los resultados. Esto ocurre con otros marcadores y puede conllevar a interpretaciones erróneas de los resultados, ya que son aspectos que no siempre están controlados o que son difíciles de controlar en los estudios de investigación. Estos aspectos metodológicos fundamentales están mejor controlados en los trabajos de los últimos años, puesto que no siempre

se tenía conocimiento de ellos en los trabajos más antiguos.

A pesar de que los resultados de los estudios de parámetros inmunes en los TEA no son concluyentes, ni siquiera comparables, analizando los datos de manera conjunta, nos encontramos con algunos puntos a remarcar que sugieren una alteración en los perfiles de activación y la función inmune adaptativa celular.

En los estudios que han valorado los niveles de los parámetros inmunes derivados de la línea monocitaria (CD14) se ha visto presencia de marcadores de activación de dicha línea monocitaria CD95 (94), lo que junto con la sobreproducción de citoquinas, indica la activación de esta línea celular. Concretamente respecto a las citoquinas derivadas de esta línea monocitaria se han visto aumentados los niveles de TNF-alfa (100) (112) y sus receptores solubles I y II (100), así como la IL-12 (97), IL-12p40 (106) (94) y la IL-12p70 (108) y aun cuando no se ha visto aumento de los niveles de la IL-1 (112), sí se ha visto un aumento de los niveles de sus tres isoformas IL-1-alfa (106), IL-1-beta (100) (108) e IL-1RA (101) (108). Por último también se ha visto un aumento en los niveles de la IL-8 (94) (108). El aumento de los niveles de estas citoquinas en muchos de los trabajos que hemos revisado es indicativo de una mayor actividad de esta línea monocitaria.

Cabría esperar que la sobreestimulación de la línea monocitaria derivara en una estimulación de la línea linfocitaria Th1 o de la Th2. En el análisis de los datos no se observa un aumento de las citoquinas derivadas de la línea Th1,

IL-2 (102) (91) (112) (108) e IFN-gamma (100) (106) (112) (108) y tampoco se ha visto un aumento en la expresión linfocitaria del receptor de la IL-2 (CD25) (87) propio de la línea Th1. Sin embargo, sí se observa un aumento en los niveles de citoquinas derivadas de la línea linfocitaria Th2, con un aumento de las citoquinas proinflamatorias IL-4 (118) (102) e IL-6 (100) (112) (106) (94) y de la citoquina compensadora IL-13 (102) (108).

Parece así que en los niños con TEA se da un aumento en la activación de la línea monocitaria y de la rama Th2 de la línea adaptativa sin la compensación o regulación de la citoquina compensadora IL-10 (91) (119) (118) (100) (101), de modo que se da una situación de sobreestimulación de la rama Th2, provocando una situación proinflamatoria, sin la regulación de las citoquinas compensadoras.

De modo que analizando los niveles de citoquinas mediadoras de la respuesta inmune podría decirse que en los individuos con TEA parece producirse una situación proinflamatoria por una activación de la línea monocitaria y linfocitaria de tipo Th2. Esta activación inmune se produce por una proliferación de las células monomorfonucleares periféricas (líneas celulares monocitaria y linfocitaria) y un aumento de la acumulación plasmática de los antígenos solubles derivados, citoquinas, receptores de citoquinas y moléculas de adhesión. Esto va a traer consigo una situación proinflamatoria ya que en sí mismo, el sistema fagocítico monocitario es un mediador de los mecanismos de inflamación y por otro lado es un sistema presentador de antígenos y por tanto, establece una conexión directa con la respuesta inmune adaptativa y su activación con la consecuente situación proinflamatoria derivada de la estimulación de la línea linfocitaria Th2.

La respuesta proinflamatoria mantenida por la falta de mecanismos reguladores podría provocar una pérdida de tolerancia a los antígenos propios en los TEA con consecuencias inmunológicas.

Una vez que el sistema inmunitario se activa y consigue eliminar al foráneo, debe de haber un reequilibrio para la compensación y de los mecanismos de la respuesta inmune, de modo que una respuesta inmune incontrolada va a producir una respuesta frente a las propias estructuras del organismo.

En este caso, la situación que se produciría se iniciaría en las células endoteliales, epiteliales y fibroblastos que en presencia mantenida de

citoquinas proinflamatorias son capaces de expresar moléculas accesorias, que aumentan en condiciones de inflamación y se han relacionado con la presentación de antígenos, en este caso moléculas que son antígenos propios. Así estas células, que son células propias, funcionan en situaciones de inflamación mantenida como células presentadoras de antígenos propios. Para compensar estas situaciones hay un tipo adicional de linfocitos que son los linfocitos reguladores, últimos responsables de mantener las situaciones de tolerancia.

La tolerancia es una capacidad no innata sino adquirida y específica que se desarrolla a lo largo de la vida desde el período fetal y hasta la pubertad, sobre todo los dos primeros años de vida, en los que desde la médula ósea y el timo partirá la información para eliminar o inactivar aquellos linfocitos con capacidad para reaccionar contra antígenos del propio cuerpo. También deben desarrollarse los linfocitos T reguladores, encargados de que no se produzca una respuesta contra estos antígenos propios.

Esta situación inmunológica activa no parece estar compensada por los mecanismos reguladores inmunes que deberían estar activados. Tanto la presencia de citoquinas reguladoras como la IL-10 (91) (119) (118) (100) (101), como los procesos en los que están implicados los linfocitos T reguladores y la apoptosis celular son mecanismos que parecen estar afectados.

Se han hecho estudios en los TEA para valorar la funcionalidad de los linfocitos T reguladores, encontrándose una disminución en los niveles de los linfocitos

que juegan un importante papel en el establecimiento de la auto-tolerancia inmunológica y la prevención de la autoinmunidad(CD3+GITR+, CD4+GITR+, CD8+GITR+, CD4+CD25(alta)) (96) (93) .

Algunos investigadores han relacionado los TEA con la mayor susceptibilidad a padecer enfermedades autoinmunes. Las enfermedades autoinmunes son aquéllas producidas por alteraciones inmunológicas que desencadenan una respuesta errónea, elaborando autoanticuerpos capaces de atacar estructuras del propio organismo (123).

Mostafa y colaboradores (2009) estudiaron en 80 niños con TEA comparándolos con 80 niños de desarrollo típico pareados, la presencia de anticuerpos antinucleares (autoanticuerpos frente a antígenos intracelulares, que se utilizan como marcadores de autoinmunidad) y vieron que los niveles de estos autoanticuerpos eran significativamente superiores en los TEA que en controles. Además, el título de anticuerpos antinucleares estaba significativamente relacionado con la gravedad de los síntomas, con el retraso mental y con las alteraciones electroencefalográficas (120).

Este mismo equipo en el 2011 investigó en los TEA los autoanticuerpos antirribosomales P (que se encuentran en el citoplasma celular) y vio que estaban presentes en un 44,3% de los TEA. Estos autoanticuerpos se unen a epítopes de la superficie de la membrana celular, penetran en la célula, inhiben la síntesis de proteínas y producen citoquinas proinflamatorias y apoptosis celular (121).

Estos dos estudios podrían ser la base para sospechar la pérdida de tolerancia inmune que podría contribuir a la etiopatogenia de los TEA.

Sistema inmune y sistema nervioso en los TEA

En esa línea de investigación del sistema inmune en los TEA y debido a la naturaleza neurológica de esta enfermedad, se ha estudiado la posibilidad de que la situación inmune sistémica que se produce en los TEA tenga un reflejo a nivel del sistema nervioso.

Se ha visto en el tejido cerebral niveles alterados de citoquinas proinflamatorias (123) o de determinados mediadores inmunes relacionados con la apoptosis neuronal (103) que pudieran estar asociados a procesos de generación de autoanticuerpos frente a proteínas o estructuras cerebrales en los TEA y que hacen pensar que en los TEA se produce neuroinflamación (129). En apoyo a esta hipótesis Chez y colaboradores (2007) estudiaron 10 niños con TEA y observaron niveles de TNF-alfa significativamente elevados en líquido cefalorraquídeo en relación a los niveles séricos, con una relación líquido cefalorraquídeo/suero de 53,7/1 (122).

Mostafa y colaboradores (2011) basándose en la posibilidad de que en los TEA hubiese un cuadro de neuroinflamación, midieron los niveles de neuroquinina A plasmática, un péptido proinflamatorio de tipo taquiquinina que a su vez

aumenta las respuestas inflamatorias periféricas. Se vio que un 57 % de los niños con TEA tenían niveles más altos de neuroquinina A que los controles y que los niños con TEA más severo alcanzaban niveles aún más altos de este péptido. Con ello relacionaron la neuroinflamación con la respuesta inflamatoria periférica (121). Según Vargas y colaboradores (2005) este proceso neuroinflamatorio activo podría extenderse a la corteza cerebral, materia blanca y cerebelo (124).

Estudiando muestras de líquido cefalorraquídeo, se ha visto que existe en el sistema nervioso central de individuos con TEA una sobrerregulación de HLA-DR, marcador de la activación leucocitaria, y un aumento de los niveles de citoquinas proinflamatorias, como TNF-alfa (124) (125) y sus receptores TNFRI (124) y TNFRII (124) (126) y otras interleuquinas como IFN-gamma (125), IL-6 (124) (125), MCP-1, MIP-1b (124), GM-CSF (125) e IL-1b (124), al igual que se han encontrado las citoquinas Th1 significativamente aumentadas (127) (125). Además se han visto aumentados en el tejido cerebral de los pacientes con TEA los niveles de catepsina D, una proteasa lisosomal que juega un importante papel en la apoptosis del tejido cerebral y en la regulación de la inflamación inducida por citoquinas (128).

Una serie de estudios han investigado aspectos de autoinmunidad que implican a estructuras del sistema nervioso central. Mostafa y colaboradores (2011) con el fin de estudiar la posible asociación entre la neuroinflamación y la autoinmunidad en el sistema nervioso central en los TEA, midieron los niveles séricos de osteopontina, una citoquina proinflamatoria que se ha visto que

juega un papel importante en varias enfermedades autoinmunes neuroinflamatorias. Esta citoquina induce la producción de IL-17 por parte de los linfocitos Th17 a los que se les ha responsabilizado de tener un papel importante en los procesos de autoinmunidad. Los resultados de este estudio fueron que el 80-95% de los niños con TEA tenían niveles significativamente más altos de osteopontina que los controles sanos (110).

En relación a los estudios en los TEA sobre la presencia de autoanticuerpos frente a proteínas o estructuras del tejido cerebral y frente a determinadas células específicamente cerebrales cuya presencia podría sugerir una pérdida de autotolerancia que pudiera estar relacionada con la neurobiología de los TEA, se ha visto presencia de anticuerpos frente a proteínas de filamento de neuroaxon (130) (131), proteína glial fibrilar ácida (anti-GFAP) (131), factor de crecimiento neuronal, factor neurotrófico derivado del cerebro (132) (133) (134) (135) y mielina básica (130).

Con el fin de estudiar la distribución regional de autoanticuerpos en el sistema nervioso central, Singh y colaboradores (2004) estudiaron 68 niños con TEA y los compararon con 30 controles normales de entre 4 y 12 años. Enfrentaron el suero de los niños frente a anticuerpos de rata y observaron que los sujetos con TEA, pero no los controles, presentaban anticuerpos frente a tres proteínas procedentes de distintas regiones del núcleo caudado (136).

Mostafa y colaboradores (2010) estudiaron la positividad antineuronal en un grupo de 44 niños con TEA comparando con 44 niños normales pareados en

edad, incubando el suero de los sujetos con muestras de trozos de cerebelo de primates, viendo niveles de positividad antineuronal alta en los sujetos con TEA (137). En el año 2012 este mismo equipo midió los niveles de autoanticuerpos antineuronales séricos mediante inmunofluorescencia indirecta de 80 niños con TEA de entre 6 y 12 años, comparando con 80 niños sanos pareados. El resultado fue que el 62% de los niños con TEA tenían autoanticuerpos antineuronales frente al 5% de los niños sanos. Además, al comparar los resultados con la gravedad de los síntomas mediante la escala CARS, en niños con TEA severo la positividad de anticuerpos antineuronales era del 87,5% frente al 25% que se observaba en los que presentaban TEA moderado (138).

Mostafa y colaboradores (2011) estudiaron también los niveles de autoanticuerpos frente a gangliósidos M1, una familia de glicofosfolípidos expresadas en la cara más externa de la membrana plasmática de todas las células de los vertebrados, especialmente frecuentes en el sistema nervioso y relacionados con la neurotransmisión, de los que el gangliósido M1 es el gangliósido más abundante en la membrana neural. En este estudio reclutaron un grupo de 54 niños con TEA de entre 4 y 12 años y un grupo control de niños sanos pareados en sexo y edad. Los resultados fueron que el 74% de los niños con TEA (40/54) tenían autoanticuerpos antigangliósido M1 y que los niveles de estos autoanticuerpos eran más altos en los niños con autismo grave (63 %) que en aquellos con autismo moderado (37 %), con una correlación positiva con los síntomas comportamentales medidos según la escala CARS (139).

En relación a los estudios de autoanticuerpos frente a estructuras propias

neuronales, Mostafa y colaboradores (2008) investigaron la presencia de autoanticuerpos antimielina asociados a glicoproteínas y se vieron en el 62,5% de los niños con TEA más frecuentemente que en niños sanos (140). Respecto a los autoanticuerpos frente a proteína mielina básica o MBP se han visto en el 58% (141) y en el 80% (142) de los niños con TEA niveles significativamente más altos que en los niños sanos. También a los autoanticuerpos de isotipo IgG frente a proteína de filamento de neuroaxon y proteína acídica fibrilar glial se han encontrado significativamente aumentados en sujetos con TEA en comparación con controles normales (131).

Parece así que en los TEA puede darse una situación sistémica proinflamatoria, con una posible pérdida de tolerancia y la presencia de autoanticuerpos frente a estructuras y proteínas propias en el sistema nervioso central, que podrían justificar algunas de las alteraciones del comportamiento propias de su fisiopatología.

Sistema inmune y sistema digestivo en los TEA

De la misma manera que en el sistema nervioso, las alteraciones del sistema inmune en los TEA se han visto reflejadas en el tracto digestivo. Aunque se sabe que el tejido linfoide asociado a la mucosa del tracto gastrointestinal es el órgano linfoide más grande del cuerpo, se conoce menos la capacidad funcional inmune digestiva que la función inmune en sangre periférica. En el tejido digestivo se concentra aproximadamente el 80% del sistema inmune; en el intestino residen al menos el 50% de los linfocitos T, distribuidos en la lámina propia (LP) y en la capa mucosa. Este tejido está en contacto permanente con alimentos y con microorganismos, tanto comensales como otros potencialmente patógenos, condiciones por las que en él existe un delicado equilibrio entre la activación y la regulación inmune para mantener la homeostasis fisiológica.

Los trabajos en relación a la respuesta inmune en el tejido intestinal en los TEA se han hecho tomando biopsias de distintas porciones del tracto digestivo y estudiando la expresión de los parámetros inmunes.

Los primeros autores que asociaron los TEA a una alteración intestinal fueron Wakefield y colaboradores (1998) estudiando la asociación entre íleocolitis y regresión de desarrollo en 12 niños y observando una hiperplasia linfonodular ileocólica a la que llamaron “enterocolitis autista” en la mayoría de los niños con TEA que estudiaron y que consideraron patológica (47). Estos mismos autores

decidieron hacer biopsias ileocólicas en 60 niños con alteraciones del desarrollo, 83% con autismo, de los que 59 tenían uno o más síntomas gastrointestinales (por ejemplo, dolor abdominal, estreñimiento, diarrea o cambios en la consistencia de las heces), describiendo entonces una hiperplasia linfonodular colónica de media a moderada en el 93% de los niños, con signos histológicos de colitis crónica en el 88% de los niños y un aumento en el número de los linfocitos intraepiteliales en el 13% de los niños (299). Posteriormente, el equipo de Wakefield (2005) volvió a hacer exámenes histológicos en niños con TEA comparando con niños sanos y observaron una hiperplasia linfonodular ileal en los niños con TEA en el 90% de los casos, frente al 30% de los niños sanos. Estaban además afectados de una forma más severa y asociada a una hiperplasia linfonodular colónica el 59% en niños con TEA frente al 23% de los niños sanos (300). Los trabajos de Wakefield y colaboradores de los años noventa mantenían que el 91% de los niños con autismo regresivo y síntomas gastrointestinales mostraban inflamación crónica en el colon (47). Aunque partían de unas hipótesis prometedoras, las dificultades asociadas a estos trabajos, que incurrieron en graves irregularidades éticas y científicas han hecho que hoy en día estos trabajos estén en entredicho y de hecho, 10 de sus 13 autores se han retractado de las conclusiones (ver Anexo 2).

Horvath y colaboradores (1999) en un estudio de 36 niños con TEA detectaron duodenitis crónica compatible con enfermedad celíaca en el 70% de los niños, que presentaban una mayor densidad de células de Paneth en el fondo de la vellosidades intestinales (51). Furlano y colaboradores (2001) estudiaron

biopsias ileocólicas en 21 niños con TEA y síntomas gastrointestinales e hicieron una comparación ciega con 8 niños con histología normal y 10 niños de desarrollo típico con hiperplasia linfonodular ileocólica, 15 con enfermedad de Crohn y 14 con colitis ulcerosa mediante técnicas inmunoquímicas, para analizar las líneas celulares linfocitarias. Los resultados reflejaron una colitis linfocítica en los niños con TEA, menos severa que en la colitis ulcerosa pero con una densidad y número de linfocitos CD8 y CD3 intraepiteliales mayor que en los controles normales y que en enfermedad de Crohn e hiperplasia linfonodular ileocólica y con parámetros inmunes que sugerían una respuesta predominantemente Th2 (154), de modo que parecía haber una cierta inflamación intestinal con infiltración linfocitaria en los sujetos con TEA.

Torrente y colaboradores (2002) con el fin de valorar las poblaciones leucocitarias en el tejido digestivo, estudiaron por inmunohistoquímica biopsias de intestino delgado en 25 niños con autismo regresivo y las compararon con 11 controles con enfermedad celiaca, 5 con parálisis cerebral y retraso mental y 18 controles histológicamente normales. Se vio una infiltración linfocitaria en TEA regresivo que era menor en epitelio y mayor en lámina propia, en comparación con enfermedad celíaca (155).

Con el fin de caracterizar las líneas leucocitarias en el tejido intestinal de los TEA, Ashwood y colaboradores (2003) estudiaron el infiltrado mucoso epitelial y de lámina propia mediante citometría de flujo en 52 niños con TEA y los compararon con 25 niños histológicamente normales y 54 niños con muestras intestinales que mostraban inflamación en análisis histológico. Se observaron

linfocitos intraepiteliales CD3 y CD3CD8 y linfocitos de lámina propia CD3 en los TEA en niveles similares a los de controles inflamados y de CD3CD4 en mayor cantidad que en controles inflamados. En lámina propia se observaron niveles de CD3 similares a los encontrados en controles inflamados y niveles de linfocitos B CD19 mayores que en controles inflamados. De igual manera se observaba un prominente infiltrado eosinofílico en los niños con TEA, comparado con los niños controles no inflamados (156). Respecto a los niveles de citoquinas producidas por dichas poblaciones leucocitarias, este mismo grupo de autores un año después (2004) estudió biopsias en 21 niños con TEA, comparándolas con 65 biopsias control de niños sanos de los que 38 tenían signos de inflamación histológica. Se vieron aumentados los niveles de citoquinas TNF-alfa, IL-2, IFN-gamma producidos por los leucocitos CD3 de lámina propia y epiteliales respecto a controles y que los niveles de IL-10 compensadora eran menores en los TEA comparado con controles no inflamados (157).

Con respecto a la mucosa colónica, en los trabajos de Ashwood y colaboradores (2003, 2004, 2006) se observó que la población de linfocitos T estaba aumentada y que los niveles de citoquinas TNF-alfa, IL-12, IL-4 e IFN-gamma estaban aumentados y llegaban a los niveles de enfermedad de Crohn, mientras que los niveles de citoquina compensadora IL-10 estaban disminuidos en comparación con los controles de enfermedad de Crohn y no inflamados (156) (157) (158).

Además de los resultados encontrados en la mucosa intestinal, los estudios

sobre mucosa gástrica también reflejan alteraciones. Horvath y colaboradores (1999) observaron en una muestra de 36 niños con TEA de entre 5 y 8 años y síntomas gastrointestinales, gastritis crónica en el 42% de los niños. En las muestras histológicas de estos pacientes se vio un aumento del número de agregados linfoides e infiltrados linfocíticos en la mucosa gástrica, con alteración moderada de las glándulas cercanas (51). Torrente y colaboradores (2004) estudiaron la población linfocitaria presente en el estómago de 25 niños con TEA, comparándola con controles de niños sin TEA, 10 niños con enfermedad de Crohn, 10 con infección por “*Helicobacter pylori*” y 10 histológicamente normales. Se vieron distintos patrones de gastritis difusa, con infiltración predominante de linfocitos CD4 en infectados por “*Helicobacter pylori*” donde el epitelio gástrico de los TEA presentaba una alteración comparable a la de la enfermedad de Crohn (153).

Estas observaciones sugieren una patología inflamatoria en los TEA distinta del síndrome de Crohn, la colitis ulcerosa o la enfermedad celíaca. Cabe destacar, entre otros, una distribución del perfil de las poblaciones linfocíticas CD3 y de las citoquinas proinflamatorias en el intestino grueso y delgado con una disminución de la actividad reguladora (157) (158) (155), además del prominente infiltrado eosinofílico de la mucosa (156).

Algunos autores han estudiado la posibilidad de que una parte del status inmune intestinal en los TEA pudiera tener que ver con algunos antígenos dietéticos concretos. Jyonouchi y colaboradores (2005) observaron una mayor reactividad inmune estudiando un grupo de 109 niños con TEA de entre 2 y 10

años, de los que 75 tenían síntomas gastrointestinales y 34 no, frente a controles. Compararon la muestra de TEA con 34 controles sanos de los que 15 tenían hipersensibilidad alimentaria no alérgica y 19 no mostraban dicha hipersensibilidad. Observaron que los niños con TEA y síntomas gastrointestinales tenían una mayor prevalencia (>70 %) de reactividad inmune celular frente a la proteína de la leche de vaca y algo menor frente a la gliadina (59).

También se ha relacionado la presencia de infiltrado linfoide intestinal con las dietas libres de gluten y caseína. Ashwood y colaboradores (2003) estudiaron 52 niños con TEA y síntomas gastrointestinales comparándolos con 79 niños sin TEA de los que 54 previamente tenían biopsias intestinales inflamatorias. Dividieron a los niños con TEA en dos grupos: los que seguían dieta libre de gluten y caseína y los que no. Realizaron biopsias intestinales de duodeno, íleon terminal y colon transversal a estos niños y observaron que los niños con TEA presentaban un infiltrado eosinofílico prominente en la mucosa y que éste era significativamente menor en los que seguían dieta libre de gluten y caseína y dicho infiltrado eosinofílico parecía diferente de la de otras enfermedades intestinales inflamatorias que presentaban los controles (156). Este mismo grupo un año después estudió 21 niños con TEA de entre 2 y 16 años con y sin dieta libre de gluten y caseína, comparándolos con otro grupo de 86 niños de desarrollo típico de los que 18 eran histológicamente normales y el resto presentaban alteraciones digestivas histológicas. Los niños con TEA que no seguían dieta presentaban una mayor producción de TNF-alfa por los linfocitos T de la mucosa colónica y un aumento de citoquinas proinflamatorias en

intestino delgado y grueso, con una disminución de las citoquinas compensadoras mayor que en los niños con TEA que llevaban dieta y que en controles (157).

Los estudios en relación a la producción de citoquinas bajo estimulación con proteínas de la dieta han dado como resultado niveles elevados de citoquinas proinflamatorias. Jyonouchi y colaboradores (2002) midieron la producción de citoquinas inflamatorias intestinales (IFN-gamma, IL-5 y TNF-alfa) por monomorfonucleares (linfocitos y monocitos) frente a proteínas de la dieta (gliadina, proteína de la leche de vaca y soja). Reclutaron a 72 niños con TEA y los compararon con 24 niños con intolerancia a las proteínas de la dieta, 26 hermanos de desarrollo típico y 15 niños sanos no relacionados. En 56/72 de los niños con TEA se vio que producían niveles mucho más altos de citoquinas proinflamatorias que los controles al estimular con proteínas de la dieta y mejoría de los síntomas tras hacer una dieta libre de gluten y caseína (159).

En algunos estudios en TEA se han buscado anticuerpos frente a proteínas de la dieta. Lucarelli y colaboradores (1995) estudiaron 36 niños con autismo de entre 8 y 13 años. Les pusieron a dieta libre de leche de vaca y de otros alimentos frente a los que daban test de piel positivo, durante un período de 8 semanas. Tras la dieta se observó una notable mejoría de los síntomas autistas según la escala BSE (Behavioral Summarized Evaluation). Midieron los niveles de inmunoglobulinas frente a antígenos dietéticos en estos niños y compararon los resultados con 20 controles sanos y encontraron en los niños con TEA niveles altos de IgA específica frente a caseína y lactoalbúmina y de las IgG e

IgM frente a caseína (160).

Kawashti y colaboradores (2006) estudiaron 30 niños con TEA de entre 3 y 6 años y los compararon con 30 hermanos de desarrollo típico. Midieron los anticuerpos circulantes de tipo IgA e IgG frente gluten y caseína mediante inmunoensayo (EIA). Se vio que el 83,3% de los niños con TEA eran altamente seropositivos frente a la caseína y el 50% frente al gluten comparado con sus hermanos controles que eran un 10% y el 6,7% respectivamente (161).

Aumento de permeabilidad intestinal en los TEA

Algunos autores han hipotetizado que los TEA pudieran tener aumentada la permeabilidad intestinal, de modo que péptidos pequeños entre los que pudieran estar la beta-7-casomorfina pudieran pasar la barrera intestinal de forma masiva.

Los métodos clásicos para evaluar in vivo la permeabilidad intestinal se basan en dar al paciente por vía oral determinadas sustancias marcadoras de diferentes tamaños moleculares que no se metabolizan y evaluar al cabo de unas horas el porcentaje de su eliminación urinaria, lo que será reflejo de su absorción. Moléculas de pequeño tamaño, como el manitol y la ramnosa, podrían atravesar la barrera intestinal por cualquier TJ (Tight Junction, uniones celulares fuertes) del epitelio intestinal, pero las de mayor tamaño, como la

lactulosa y la celobiosa sólo podrían atravesar por las TJ del fondo de la cripta, que por otra parte son menos accesibles por presentar menos contacto con la luz intestinal. En el caso de que las moléculas grandes atravesen la barrera intestinal sería una prueba de un aumento de la permeabilidad intestinal.

En los estudios en los que se ha valorado la permeabilidad intestinal en los TEA se ha utilizado el test de la lactulosa/manitol. En dicho test el manitol debe absorberse entre un 5 y un 30%, en tanto que la lactulosa debe hacerlo en cantidades inferiores al 0,5%. Nos encontraremos con niveles séricos de manitol mucho mayores que los correspondientes a la lactulosa y la relación de absorción entre ambas moléculas nos dará el grado de inflamación intestinal. De la misma manera, podremos encontrar en orina niveles cuantificables de manitol y no así de lactulosa.

D'Eufemia (1996) fue el primero en investigar la permeabilidad intestinal en los TEA usando el test de lactulosa/manitol en 9 niños con TEA y sin alteraciones intestinales conocidas mediante hallazgos clínicos ni de laboratorio, comparándolos con 21 controles sanos. En estos pacientes se detectó manitol en orina de forma similar a la de los controles, mientras que la lactulosa urinaria estaba muy aumentada, de modo que se podría especular que había una alteración en la permeabilidad intestinal en los sujetos con TEA (193). De Magistris (2010) también encontró alterada la permeabilidad intestinal mediante el test lactulosa/manitol en sujetos con TEA. Compararon dos grupos de sujetos con TEA con y sin dieta libre de gluten y caseína y observaron que todos tenían alterada la permeabilidad intestinal, siendo esta alteración más

marcada en aquellos sujetos que no estaban a dieta (50), relacionando así este aumento de permeabilidad intestinal con determinadas proteínas de la dieta.

Un tercer estudio que también utilizó esta prueba para valorar la permeabilidad intestinal en los sujetos con TEA no llegó a las mismas conclusiones. Robertson y colaboradores (2008) reclutaron un grupo de 14 niños con TEA de entre 4 y 12 años pero con algún síntoma intestinal en el momento de los análisis o en un momento anterior y compararon este grupo con 7 hermanos y 8 controles sanos, ambos sin síntomas gastrointestinales y pareados en edad. Se observaron diferencias de al menos 2 veces la relación lactulosa/manitol entre los casos y los controles a favor de una mayor permeabilidad en el caso de los sujetos con TEA y síntomas gastrointestinales (194). Basándose en los trabajos de Van Elburg (1993) (195) y de Marsilio (1998) (196) sobre la enfermedad celíaca, no se consideró que estas diferencias pudieran ser determinantes, ya que según estos trabajos para que estos valores pudieran ser indicativos de una alteración en la permeabilidad intestinal, la diferencia de la relación entre controles y pacientes debería de ser de al menos seis veces. Por tanto, el estudio de Robertson, con estos criterios restrictivos, concluyó que los TEA no presentaban alteraciones en la permeabilidad intestinal. Sin embargo, cabe destacar que aun cuando estos autores concluyen que los niños con TEA no presentan un aumento de la permeabilidad intestinal, lo hacen por comparación con los valores que hubieran sido esperados en la patología celíaca. En los estudios anteriores se considera que hay un aumento de la permeabilidad intestinal puesto que se observa una diferencia significativa respecto a la relación lactulosa/manitol de casos frente a controles sin tomar

como referencia ninguna otra patología intestinal.

De existir un aumento de la permeabilidad intestinal, ésta podría justificarse por la alteración del sistema inmune o de la flora localizada en el epitelio intestinal. El sistema inmune está íntimamente relacionado con la función de la barrera intestinal y las situaciones de inflamación del intestino se asocian con el aumento de la permeabilidad de la barrera (301). En situaciones inflamatorias de intestino o de desequilibrio inmune intestinal e incluso cuando hay un desequilibrio de flora intestinal, se produce la liberación de citoquinas que modifican las uniones de las células epiteliales TJ, provocando como consecuencia la alteración de la función de la barrera intestinal con un aumento de la permeabilidad de ésta (302). En esta situación de inflamación intestinal con aumento de la permeabilidad de la barrera intestinal, podrían absorberse productos derivados de la dieta, que en condiciones normales no se absorberían.

Alteraciones en la actividad de la dipeptidil peptidasa IV en los TEA

La dipeptidil peptidasa IV (también llamada CD 26 o proteína de unión a la adenosina deaminasa, ADABP) (DPPIV) es una proteasa que pertenece a la familia de las proliloligopeptidasas que tiene una importante actividad no sólo enzimática sino también moduladora de quimioquinas, hormonas peptídicas y neuropéptidos, con un papel regulador en procesos inmunes y endocrinos

(303).

La DPPIV se encuentra en intestino y en sangre. En el intestino se encuentra en la superficie celular de las células de cepillo. En esta localización presenta una actividad puramente enzimática, generando dipéptidos (no aminoácidos, como otras amino-peptidasas) a partir de polipéptidos largos, de una manera secuencial. La DPPIV tiene una especificidad de sustrato muy selectiva y separa los fragmentos desde el extremo N-terminal detrás de los residuos de prolina.

En sangre, la DPPIV está predominantemente presente como un activador antigénico en la membrana de linfocitos. En esta situación la DPPIV se encuentra muy relacionada con la ADA (adenosina deaminasa). Tanto la DPPIV como la ADA están presentes en linfocitos T y asociadas entre ellas, teniendo una posible interacción. Hay dos isomorfos de la ADA de las que sólo una de ellas se une a la DPPIV, la ADA1.

Respecto a su actividad como modulador inmune presenta dos funciones, la de transducción de membrana y la de actividad enzimática. La función de transducción de membrana de la DPPIV está directamente relacionada con la cantidad en la que se encuentra en la superficie celular (denominada en este caso CD26), mientras que la actividad enzimática (denominada como DPPIV) es independiente de su presencia en la superficie celular (304).

Además de en las membranas de linfocitos T, se ha visto DPPIV en linfocitos

NK activados y linfocitos B y en un número de células endoteliales y epiteliales diferenciadas (305). El papel de la DPPIV en el sistema inmune es una combinación de la actividad exopeptidasa y su interacción con diferentes moléculas. Esta enzima está capacitada para servir como molécula coestimuladora, para influir sobre la actividad de los linfocitos T y modular la quimiotaxis (303) (306). La DPPIV interactúa con numerosas proteínas como el receptor de quimioquinas CXCR4, que está relacionado con la migración interneuronal (307) y con el CD45 (proteína tirosina fosfatasa que se expresa en todas las células hematopoyéticas nucleadas). La función de la DPPIV es regular el umbral de señal de receptor y puede afectar el desarrollo temprano de los timocitos (linfocitos T sin diferenciar) (308). Muchas de las moléculas proinflamatorias, incluyendo los péptidos que tienen que ver con el TNF-alfa y las quimioquinas atrayentes de monocitos y linfocitos T, tienen semividas plasmáticas controladas por la DPPIV (309).

La actividad de la DPPIV puede variar en función de una serie de factores, como el nivel de desarrollo o la edad y el sexo o determinadas situaciones de daño tisular o patologías tanto inmunes como mentales. Durinx y colaboradores (2001) determinaron los valores de referencia sanguíneos de la actividad de la DPPIV y lo relacionaron con parámetros como la edad, sexo, presión sanguínea e índice de masa corporal. Estudiaron 481 sujetos sanos de entre 19 y 61 años, de los que 213 eran hombres y 268 eran mujeres y los dividieron en categorías de edad. Observaron una disminución de la actividad con la edad y una actividad ligeramente menor en mujeres que en hombres (310).

Parece que el daño intestinal puede afectar también a la actividad de esta enzima. Detel y colaboradores (2007) han visto que en niños con daño intestinal, como por ejemplo en síndrome de malabsorción o celiaquía, la actividad de la DPPIV en intestino delgado estaba inversamente relacionada con el daño, con menor actividad a mayor daño, mientras que no se han observado diferencias significativas proporcionales en la actividad sérica de esta enzima (197). Jarmolowska (2007) en un grupo de niños lactantes con síntomas de dermatitis atópica observó que la beta-casomorfina tenía una vida media mayor, lo que estaba asociado a una baja actividad sérica de la DPPIV (198).

Otras situaciones morbosas que se han asociado a una disminución del efecto de la DDPIV son, por ejemplo, la apnea y algunas enfermedades mentales (199) (200). Se ha visto que el suero de algunos niños que han sufrido un episodio de apnea, contiene más cantidad de beta-7-casomorfina y presentan menor actividad de la DDPIV (199). También se ha visto disminución en la actividad de esta enzima en depresión mayor y esquizofrenia, observándose una relación inversa entre la actividad enzimática y los síntomas (200) (201).

Algunos autores han determinado el porcentaje de células monomorfonucleares que expresaban DPPIV en pacientes con TEA. Hunter y colaboradores (2003) estudiaron la actividad de la DPPIV en plasma mediante ELISA en un grupo de 10 niños con TEA de entre 2 y 10 años y la compararon con 10 hermanos sanos y con 11 adultos, determinando que el porcentaje de células mononucleares que expresaban DPPIV (CD3 y CD26) era menor en los

TEA que en los controles (89). En otro estudio, Vodjani y colaboradores (2004) determinaron el porcentaje de células mononucleares que expresaban DPPIV (CD3 y CD26) y también la presencia de anticuerpos contra las peptidasas. Compararon 50 niños sanos, 50 niños con TEA y 50 sujetos con enfermedades del tejido conectivo y encontraron un porcentaje sensiblemente menor de células monomorfonucleares que expresaban DPPIV en el grupo con TEA y también que algunos niños con TEA habían desarrollado anticuerpos anti-DPPI, anti-DPPIV (o CD26) y anti-aminopeptidasa N (CD13) (202). Sin embargo, esta menor expresión de la DPPIV en los monomorfonucleares no parece que se de en todas las subpoblaciones de esta línea leucocitaria en los TEA. En un estudio se ha visto aumentada la expresión de la DPPIV en la subpoblación de linfocitos T CD8 en los TEA (94).

Esta situación proinflamatoria mantenida en la mucosa intestinal, con el consecuente aumento de la permeabilidad intestinal y, por tanto, la ruptura de la función barrera, y la posibilidad de que la actividad enzimática de la Dipeptidil Peptidasa IV esté disminuida en los TEA, pudiera provocar un paso masivo a torrente sanguíneo de péptidos derivados de la dieta que pudieran tener efectos sobre la respuesta inmune y además sobre el comportamiento.

Influencia de la beta-7-casomorfina sobre el comportamiento en los TEA

Se ha visto en estudios de sustancias con actividad opioide sobre animales mutados sin receptor μ -, que dichas sustancias opioides pueden modificar el comportamiento de apego de los animales (203) (204) y la interacción en el juego (311) (312).

Los efectos comportamentales de la beta-casomorfina parecen reversibles con la administración de un antagonista opioide como la naloxona. En los estudios en animales que se han realizado con naloxona en dosis de 5 mg/kg se ha observado que la administración de esta sustancia aumentaba significativamente las reacciones maternas, el número de aproximaciones a las crías y disminuía la alternancia de sus transferencias a nuevas localizaciones (214) y en dosis de 1 mg/kg aumentaba las vocalizaciones en ratas domésticas socializadas y la disminuía en ratas aisladas (215).

En estudios en ratones adultos se ha visto que la administración de casomorfinas afecta la locomoción, la ansiedad, el aprendizaje y la memoria (210) (211) (212) (213).

Todos estos efectos son distintos en función de la vía de administración (313) de la edad y del sexo del animal de experimentación (314).

Las beta-casomorfinas son ligandos a receptores μ -opioides muy potentes y

específicos (188) por lo que quizás su unión a dichos receptores de lugar a alteraciones comportamentales.

Algunos estudios en animales han demostrado que la administración de casomorfina causa cambios comportamentales en ratas albino recién nacidas (205) y también en el comportamiento de las madres (208) al igual que modifican dicho comportamiento los antagonistas opioides como la naloxona (214) (216). Panksepp (1979) trató ratas recién paridas con morfina y observaron una reducción del comportamiento maternal con una disminución de la proximidad física madres-crías y el tiempo que las madres se mantenían con las crías recién paridas (209) . También trataron pollitos domésticos con casomorfina, observando que se reducían las vocalizaciones que se producían en la separación de sus madres, siendo este efecto parcialmente antagonizado por naloxona (206). Este autor pensó que esto podría ser debido a un mecanismo de feedback relacionado con la satisfacción que se tiene con los comportamientos maternos y las cualidades placenteras de la interacción social, tanto en las crías como en las madres (207).

La barrera hematoencefálica (BHE) es una puerta de entrada al cerebro, que controla el flujo de información entre sistema nervioso central y los tejidos periféricos excluyendo muchas moléculas, controlando el acceso de otras y comportándose como una barrera semipermeable como corresponde a su naturaleza de membrana celular. Esta barrera está formada por fuertes uniones entre las células endoteliales de los capilares del cerebro, que mantiene las membranas de las células individuales eficazmente unidas hasta formar una

membrana celular continua, eliminando prácticamente la totalidad del ultrafiltrado del plasma producido por las fuerzas de Starling que se produce en casi todos los demás lechos capilares.

La BHE es permeable a determinadas sustancias necesarias para el metabolismo cerebral tales como oxígeno, glucosa y aminoácidos esenciales. Además, como cualquier membrana celular, es permeable a sustancias lipídicas, no siéndolo para sustancias de baja liposolubilidad o aquellas unidas a proteínas plasmáticas.

Pero la BHE no es rígida en el tiempo ni mantiene las mismas propiedades en todas las situaciones. Aunque la BHE neonatal es madura en el sentido de que es restrictiva igual que la del adulto al paso de proteínas séricas (315) (316) y al paso de sustancias liposolubles (317), se cree que la diferencia entre las BHE neonatal y adulta son las respuestas a las distintas necesidades del desarrollo frente a las de un sistema nervioso central maduro (318). A modo de ejemplo, se ha visto que algunos sistemas de transporte mediados por transportadores específicos para péptidos presentan cambios con la edad del individuo (319). En otras palabras, la BHE se adapta a las necesidades de la maduración del sistema nervioso central.

Los movimientos de péptidos a través de la BHE tienen que ver con los mecanismos de transferencia de información que se produce a través de ella. Los péptidos pueden atravesar la BHE con un grado de penetración dependiente de parámetros farmacocinéticos como son la concentración del

péptido en el plasma, su semivida plasmática y sus características moleculares como naturaleza iónica, peso molecular y lipofilia (320).

Respecto a los péptidos de naturaleza opioide, se han visto transportadores específicos para su paso a través de la BHE. Entre ellos se encuentran en primer lugar los OATPs (Organic Anion Transporting Polypeptides) o transportadores de aniones orgánicos (para d-opioide [D-penicilamina^{2,5}]encefalina (DPDPE) y deltorfina II) (321), en segundo lugar la P-Glicoproteína (P-gp1) que es una proteína transportadora implicada en el transporte de endorfina (322) y de morfina (323) y en tercer lugar el péptido PTS-1 (Peptide Transport System-1) que trasporta otros péptidos opioides.

El péptido PTS-1 transporta péptidos pequeños por una vía saturable y dosis dependiente, mostrando esteroespecificidad para el flujo fuera del sistema nervioso central, mientras que el flujo hacia el sistema nervioso sucede por un mecanismo no saturable que no distingue entre los isómeros y transporta encefalinas, dinorfina, beta-7-casomorfina y péptidos relacionados con el sistema nervioso central (324). La unión de la casomorfina al PTS-1 resulta de mayor afinidad para la casomorfina bovina que para la casomorfina humana (325).

Desde la década de los 90 se han detectado mediante técnicas de radioinmunoensayo, casomorfina en el cerebro de niños recién nacidos (326) y hay autores que sostienen que el distinto origen de la casomorfina, bovina o humana, puede afectar al desarrollo psicomotor y neurológico de los niños

(327).

Como demostración de la presencia de beta-7-casomorfina en el sistema nervioso central en algunas circunstancias Ermisch y colaboradores (1983), en experimentos en ratas, midieron la presencia de casomorfina-5 en 18 zonas de la pituitaria poco después de su administración intra-carotidea y vieron que alcanzaba áreas cerebrales protegidas por la BHE después de la inyección, en cantidades independientes de la concentración del péptido inyectado (328). En el estudio de Banks y colaboradores (1985) estudiaron el paso de 18 péptidos relacionados con la casomorfina, viendo que algunos tenían un menor grado de permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica del que hubiera correspondido a su lipofilia (329).

Se han visto concentraciones elevadas en líquido cefalorraquídeo de beta-7-casomorfina en pacientes con psicosis posparto comparadas con mujeres sanas (330).

Se ha estudiado la estabilidad de los péptidos opioides en el sistema nervioso central, en homogeneizado de cerebro y en plasma de ratón, observándose una resistencia de la beta-7-casomorfina a la degradación enzimática por la DPPIV, también presente en el sistema nervioso central (320) (320).

Se ha relacionado en sujetos con TEA el sistema opioide con comportamientos concretos, como por ejemplo estableciendo los niveles de beta-endorfina endógena plasmática y relacionándolos con los comportamientos autistas y

autolesivos (331).

Estudios de síntesis de eficacia de naltrexona en dosis de 0,5 a 2 mg/kg/día (332) (333) muestran que de 86 pacientes con TEA y autolesiones procedentes de 27 estudios, un 47 % redujeron sus autolesiones en al menos un 50 % y se atenuaron los síntomas de hiperactividad, agitación, irritabilidad y alteraciones en el comportamiento social en un 80 %.

Sin embargo, la mayoría de los estudios son pequeños, de corta duración, no son controlados ni randomizados y los métodos de evaluación no son consistentes, por lo tanto hay que tomar las conclusiones con cautela. Sólo hay un estudio doble ciego controlado con placebo (331) y con resultados poco esperanzadores.

Hipótesis opioide en los TEA

Algunos autores han hipotetizado y buscado evidencia que apoya que los síntomas autistas, en algunos sujetos, podrían ser el resultado de la acción sobre el organismo de péptidos opioides resultantes de la ruptura incompleta de gluten y caseína procedentes de alimentos. El aumento de la permeabilidad intestinal, también llamado “síndrome del intestino permeable”, permitiría a estos péptidos atravesar la membrana intestinal, entrar en el torrente circulatorio y cruzar la barrera hematoencefálica, afectando al sistema opioide

endógeno, al desarrollo del sistema nervioso y a la propia neurotransmisión.

Dentro de la idea de que los péptidos de la dieta podrían relacionarse etiológicamente con el autismo, un grupo noruego, hipotetizó que el autismo podría ser debido a una deficiencia de peptidasas o de las proteínas reguladoras de las peptidasas, que provocarían un aumento en la entrada de exorfinas por el paso intestinal (162). Esta hipótesis surge de los estudios de Panksepp y colaboradores entre los años 75 y 85, relacionados con la variación en los comportamientos animales y la administración de opioides, incluidas casomorfina y del efecto de los antagonistas opioides (206).

Dietas libres de gluten y caseína en los TEA

La idea de que las dietas libres de gluten y caseína podrían mejorar los síntomas de los TEA empezó a gestarse basándose en los trabajos de Dohan (1984) en esquizofrenia. Este autor analizó una baja prevalencia de esquizofrenia relacionada con un bajo consumo de trigo de observaciones hechas por antropólogos en personas no consumidores de grano en las regiones de Papua Nueva Guinea ((PNG, 1950-1967) y Malaita, Islas Solomon (1980-1981) y en Yap, Micronesia (1947-1948)), donde encontraron en total dos casos de esquizofrenia mientras que en Europa hubieran sido esperados 130 casos. Cuando estas personas fueron parcialmente occidentalizadas y consumieron trigo, cebada y arroz, la prevalencia alcanzó los niveles europeos

(217).

Cuando posteriormente algunos autores encontraron patrones cromatográficos anormales en orinas de niños con autismo, compatibles con la presencia de péptidos procedentes de la dieta (218), establecieron la hipótesis de que la absorción de péptidos y derivados proteicos procedentes de la dieta pudiera tener implicaciones importantes en el desarrollo de estos trastornos (219).

Desde hace décadas algunos padres e instituciones a cargo de sujetos con TEA han implementado dietas libres de gluten y caseína basándose en dos tipos de argumentos:

1.- El gluten y la caseína tienen en su secuencia segmentos peptídicos con actividad opioide, llamados glicimorfina y casomorfina respectivamente y se presume que debido a la permeabilidad del intestino, estos péptidos podrían ser absorbidos y alcanzar el cerebro.

2.- El comportamiento autista podría estar parcialmente provocado por una alteración del sistema opioide cerebral, ya que estas sustancias modulan los procesos socio-emocionales que en esencia, es la afectación más importante de los TEA (220).

Algunos grupos de investigación han diseñado estudios para evaluar el efecto de la dieta libre de gluten y caseína en distintos grupos de niños con TEA y que presentan péptidos urinarios alterados (221) o con problemas gastrointestinales

(222) o en algún caso con sospecha de celiaquía (223) o simplemente con diagnóstico de TEA (224). En estos estudios, tras la dieta restrictiva, se ha observado mejoría de los síntomas autistas y al retirarla, la reaparición de los síntomas (226) (50). En otros estudios no observaron mejorías significativas o sencillamente evaluables (227) (228). Algunos de los padres de los niños con TEA que formaron parte de estos estudios quisieron seguir con la dieta e informaron de cambios clínicos subjetivos en sus niños cuando estuvieron con la dieta restrictiva (228). Otros autores en lugar de establecer una dieta restrictiva de gluten y caseína, han tratado a estos niños con una dieta ordinaria y un suplemento de 20 g de gluten al día, sin observar cambios físicos significativos (225).

Las limitaciones de todos estos estudios probablemente sean el tamaño y la heterogeneidad de la muestra, la falta de grupo control o placebo, posibles infracciones de la dieta por los sujetos del estudio y la falta de una medida observacional externa o la influencia de la propia intervención en los resultados (48).

En la última década se han publicado dos revisiones sistemáticas de la Cochrane respecto al uso de dietas restrictivas de gluten y caseína en pacientes con TEA. En el año 2004 en la revisión de Millward sólo se encuentra un estudio que pueda ser validado con sus criterios, de modo que se hace imposible hacer un metaanálisis (229). En este estudio, que la Cochrane termina por validar, se seleccionaron 10 niños de cada grupo participante y se hicieron las observaciones y test antes y después de un periodo de un año. Se

comprobó que el desarrollo del grupo de niños a dieta era significativamente mejor que el del grupo control (221). En este estudio de escala muy pequeña, los resultados de tres de los síntomas estudiados (síntomas cognitivos, habilidad lingüística y motora) mostraron intervalos de confianza que apoyan esta línea de investigación del uso de un tratamiento significativamente beneficioso en la dieta libre de gluten y caseína de forma combinada. Sin embargo el análisis de la Cochrane concluye que la evidencia de la eficacia de estas dietas es pobre y que serían necesarios ensayos de mayor escala (229).

En la segunda revisión sistemática de la Cochrane la conclusión es parecida, que los estudios disponibles son pocos y no controlados y que se necesita más investigación (230). Estudios posteriores más o menos rigurosos (224) reportan resultados variables.

Sin embargo se va sugiriendo que se necesitan más estudios y que quizás estas dietas sean beneficiosas sólo para un subgrupo de sujetos y que su duración debe de ser de al menos 6 meses para que tengan un período suficiente como para valorar su eficacia.

Hay muchas razones para considerar que debería de haber una justificación científica para someter a estos niños a una dieta libre de gluten y caseína (231) (232). Desde un punto de vista social supone un factor negativo añadido que puede influir en el aislamiento de estos niños (227). Desde un punto de vista nutricional, la alimentación de los niños con autismo debe ser vigilada por su particular comportamiento alimentario con una probable selectividad alimentaria

(233) (234) (235) (236) y la posibilidad de incurrir en situaciones nutricionales deficitarias.

Influencia de las dietas libres de gluten y caseína sobre el status nutricional en los TEA

En un estudio de Lockner y colaboradores (2008) se investigó la ingesta dietética y la percepción de los padres respecto a los comportamientos alimentarios de sus hijos. Se incluyeron 20 niños con TEA (3-5 años) y se compararon con 20 niños de desarrollo típico pareados en edad, sexo y grupo étnico. Se valoró la ingesta nutricional de tres días ajustando las variaciones diarias, para determinar la distribución de la ingesta habitual estimada en ambos grupos. Estos datos se compararon con las recomendaciones teóricas de la ingesta, que resultaron similares para ambos grupos, donde la mayoría de los niños consumían más cantidad de las recomendadas de la mayor parte de los nutrientes. Aunque no se observaron diferencias en la selectividad alimentaria entre los niños con autismo y los controles mediante las encuestas nutricionales, la evaluación subjetiva de los padres de los niños con TEA comparada con la de los padres de los niños de desarrollo típico, mantenía que sus niños eran comedores selectivos, más dados a comer a base de picar y resistentes a probar nuevas comidas y de hecho estos padres no describen a sus niños como comedores sanos ni como comedores de variedad de comidas (237).

Emond y colaboradores (2010) recogieron los datos de alimentación y patrones alimentarios en un cuestionario a los 6, 15, 24, 38 y 54 meses de edad, de 79 niños con TEA comparando con 12.901 niños de la población general, participantes en el estudio longitudinal de padres y niños de Avon (Avon Longitudinal Study of Parents and Children). Los niños con TEA tenían una introducción de alimentos sólidos posterior a los 6 meses y se denominaban "comedores lentos". Entre los 15-54 meses los niños con TEA pasaron a caracterizarse por ser "difíciles de alimentar" y "muy selectivos". Desde los 15 meses el grupo con TEA tenía una dieta menos variada que otros niños de su misma edad. A los 24 meses eran más dados a tomar comidas diferentes de lo que comía su madre. A los 54 meses el 8% tomaba dieta especial para alérgicos. Los niños con TEA consumían menos verduras, ensaladas y frutas frescas y menos dulces y bebidas refrescantes. A los 38 meses las ingestas de energía, grasa total, carbohidratos y proteínas eran similares a otros niños de su edad, pero el grupo con TEA consumía menos vitamina C y D (238).

Algunos autores ven grandes diferencias en esta selectividad alimentaría entre individuos con TEA y niños sanos (49) (60). Pero esto no está del todo claro y hay bastante discrepancia en los estudios relativos a los comportamientos alimentarios anormales y los TEA. Desde un punto de vista teórico la selectividad en la comida consiste en comer picando, el rechazo de determinados alimentos, limitar los repertorios de alimentos y excesiva ingesta de unos pocos alimentos o de unas pocas categorías de alimentos como carbohidratos (235).

La selectividad alimentaria que se ha descrito en los TEA se realiza según la categoría del alimento o por su textura (239), llevando una dieta autorestringida que puede llegar a limitar el consumo hasta a cinco alimentos o incluso menos (240).

Bandini y colaboradores (2010) hicieron un cuestionario alimentario de tres días en 53 niños con TEA frente a 58 niños de desarrollo típico. Determinaron la selectividad alimentaria en los TEA midiendo el rechazo a comidas (41,7% en TEA frente a 18,9% en controles) y el repertorio alimentario, que resultó ser más limitado (19 alimentos frente a 22,5) con una ingesta inadecuada de gran número de nutrientes y una alta frecuencia del consumo de un solo alimento (4 niños con TEA frente a 1 de desarrollo típico) (236). Zimmer y colaboradores (2011) estudiaron la frecuencia de la selectividad alimentaria en 22 niños con TEA y controles de desarrollo típico pareados en edad y vieron que los niños con TEA comían menos variedad de comidas que los controles (33,5 comidas diferentes frente a 55,5 comidas) (241).

Numerosos artículos anecdóticos y autobiografías de individuos del espectro autista, sugieren que podría haber factores sensoriales como olor, textura, color y temperatura que podrían contribuir a la selectividad en la comida. También podrían influir otros factores como las costumbres sensoriales, los problemas de comportamiento, las preferencias parentales y los horarios de comidas familiares (235), al igual que se ha señalado que los propios síntomas gastrointestinales pudieran contribuir a esta alteración de los comportamientos alimentarios en los TEA (49).

Estos comportamientos alimentarios selectivos podrían tener influencia sobre el índice de masa corporal (IMC). Se ha valorado el estado nutricional de los niños con TEA de entre 3 y 7 años, en relación con las alteraciones selectivas en los hábitos alimentarios. Para ello se hizo una encuesta nutricional telefónica a los padres de 85.272 niños de Massachusetts de entre 3 y 17 años y se determinó la presencia de autismo mediante la pregunta “alguna vez le ha dicho el médico o algún profesional de la salud que su hijo tiene autismo?”. Los resultados de este estudio fueron que los hábitos alimentarios de los TEA no provocan modificaciones en la prevalencia de riesgo de sobrepeso (IMC 85 percentil) y sobrepeso (IMC 95 percentil), que se vio similar a la observada en la población general en niños de las mismas edades (242). Sin embargo cuando se toman los datos relativos a niños con TEA de entre 10 y 17 años en otros estudios, con los datos de peso y altura e IMC de la Fuente Nacional de Salud infantil del 2003 de Estados Unidos, ajustado a los factores demográficos y socioeconómicos, se ve que mientras que la prevalencia de obesidad entre los niños sin alteraciones crónicas es del 12,2%, en los niños con TEA es del 23,4% (243).

Respecto a la relación entre los hábitos alimentarios y el status nutricional en los TEA, hay varios estudios. Zimmer y colaboradores (2011) estudiaron la selectividad alimentaria en relación con el aporte nutricional y vieron que los niños con TEA, que comían menos variedad de comidas que los controles, tenían mayores ingestas de magnesio y menores de otros nutrientes y presentaban riesgo de tener deficiencia en al menos un nutriente importante (241).

Respecto a la ingesta de calorías, carbohidratos y grasa se encuentra en el rango medio (244), con las calorías procedentes de la grasa en rango inferior en el caso de los TEA que en grupos de la misma edad (245) y no tan claro en relación a la ingesta de proteínas. Algunos autores sostienen que estos niños presentan una ingesta de proteínas aumentada en más del doble de las cantidades diarias recomendadas (RDA) (62), mientras que otros autores no han observado este aumento, sino al contrario, una nutrición más pobre en proteínas (246) (241), lo que estaría más de acuerdo con el hallazgo de los niveles urinarios de aminoácidos esenciales que se han visto disminuidos (244) (246) y con la observación de una deficiencia general de aminoácidos esenciales, con menores valores plasmáticos (246).

Uno de los nutrientes en los que se ha demostrado de forma consistente más déficit entre los niños con autismo es el hierro (247) (248) (249). Respecto a las vitaminas, se ha visto que los niños con TEA presentan deficiencias severas en vitamina B12 (241), B6, A, C, ácido fólico, zinc (245), calcio (241) (245) y vitamina D (241) y que tampoco cubren las recomendaciones diarias de ingesta de fibra, calcio, hierro, vitamina E y vitamina D (250). En otro estudio se han visto mayores ingestas de magnesio en los TEA que en controles (241).

Parece necesario valorar el status nutricional de los niños con TEA con y sin dieta libre de gluten y caseína, ya que cuando se instaura la dieta libre de gluten y caseína en un niño, se suprime probablemente el alimento de mayor valor nutricional que consume, la leche y se han dado casos de niños que han sufrido graves deficiencias proteicas debido a ello (251)

Cornish (2002) envió un cuestionario de ingesta dietética diaria de 3 días por correo a padres de 8 niños con TEA de entre 3 y 6 años con dieta libre de gluten y caseína y lo comparó con 29 niños con TEA con dieta normal. Se observó una ingesta por debajo de los valores recomendados en zinc, calcio, hierro, vitamina A y B12 y riboflavina en el 32% de los niños que no tenían dieta, frente a un 50% de niños que seguían dieta con déficit únicamente en zinc y calcio; éstos tomaban más frutas y vegetales, mientras que consumían menos cereales, pan y patata. La conclusión de este estudio fue que no había diferencias significativas en la ingesta de energía, proteínas y micronutrientes entre los niños con TEA y sin dieta libre de gluten y caseína (252).

Por otro lado, otros estudios han reportado una baja ingesta de vitamina D y calcio en niños con TEA con o sin dieta restrictiva y en ambos casos se puede ver comprometido el desarrollo óseo; mientras que en niños sin dieta se ha visto una desviación del desarrollo óseo de un 10%, en aquellos con dieta restrictiva se puede llegar a una desviación de casi el 20% (247). Los niños que están a dieta libre de leche de vaca y derivados presentan también menor ingesta de energía, proteínas, lípidos, calcio y fósforo, que consumen por debajo de las cantidades diarias recomendadas.

Por tanto, se recomienda que cualquier dieta restrictiva instaurada en un paciente con TEA sea controlada por un dietista especializado (233), con un enfoque específico para mejorar los comportamientos selectivos (253), debiendo tener una monitorización de la ingesta alimentaria cuantitativa y cualitativa periódica, para prevenir un inadecuado aporte de los nutrientes que

pueda afectar al crecimiento y desarrollo (254).

Hay muchos otros inconvenientes respecto a seguir una dieta en los TEA, ya que las intervenciones dietéticas en autismo son extraordinariamente complejas, no sólo por el trastorno en sí, sino también por el manejo de esta dieta en el contexto de cuidado familiar y la complejidad de otras posibles alteraciones asociadas, además de los problemas de comportamiento que trae el propio trastorno. Hay que tener en cuenta la dificultad de los padres para seguir la dieta, el coste extra de la comida y la cantidad de tiempo extra que se necesita para preparar comidas especiales (230).

Conclusiones parciales de los resultados de la muestra preliminar

Hemos conseguido detectar mayor presencia de beta-7-casomorfina en orina de pacientes con autismo y alteraciones digestivas funcionales, comparado con un grupo control de la misma edad y sexo, en una muestra preliminar de 14 sujetos.

Según estos resultados, aunque había que analizar el resto de las muestras, se podría concluir que hemos desarrollado una metodología que nos permite detectar y confirmar la presencia de beta-7-casomorfina en muestras de orina de pacientes con TEA que presentan patología intestinal asociada.

Resultados de la muestra total

Al analizar las muestras restantes, todos los resultados fueron negativos, es decir, no se detectó beta-7-casomorfina en ninguna de las muestras.

Dado lo extraño de este resultado después del resultado preliminar, repetimos los análisis en la orina restante que había en laboratorio de las 14 primeras muestras. Todos los resultados fueron negativos. Ante la posibilidad de que la muestra se hubiera degradado, se tomó nueva muestra de un sujeto que en primera fase había dado un resultado claramente positivo y el resultado fue nuevamente negativo.

Dados estos resultados, revisamos todas las fases de laboratorio del proceso, no llegando a conocer la causa de la falta de replicación de estos resultados, por lo que iniciamos una revisión de todos los posibles puntos en que la metodología pudiera haber fallado y que aparece en el apartado de discusión de la muestra total.

Una vez que se comprobó que la metodología en la fase segunda del estudio no estaba siendo fiable, decidimos, respecto a la muestra general no realizar más análisis que los descriptivos generales y el análisis principal (presencia o

ausencia de beta-7-casomorfina) entre casos y controles.

La muestra total fueron 53 sujetos de los que contabilizamos 27 pacientes y 26 controles.

Tabla 5.8. Datos socio-demográficos y clínicos en la muestra total.

	Casos (N=27)		Controles (N=26)		Valor estadístico	
Sexo (Varones) N (%)	21 (77,8)		21 (80,8)		$\chi^2=0,072$	p=0,528
	M	D.E.	M	D.E.	t	p
Edad	8,77	3,56	8,94	3,43	-0,071	0,944
Osmolaridad	821,63	200,22	1018,38	138,79	-4,14	<0,001
Creatinina	98,32	46,83	136,80	49,07	-2,97	0,005

No hay diferencias de género ni edad entre los dos grupos, pacientes y controles.

El grupo de casos tiene una osmolaridad y creatinina menores que el grupo control.

Dentro de los sujetos con TEA de la muestra total, un 48 % presentaron estreñimiento funcional (ROMA VI), un 37% aerofagia (ROMA VIII), un 18,5 % síndrome de colon irritable (ROMA II), el 14,8 % migraña abdominal (ROMA III), un 7,4 % dolor abdominal funcional (ROMA V) y otro 7,4 % incontinencia fecal no retentiva (ROMA VII) (ver tabla 5.9)

Ningún caso presentó dispepsia funcional, síndrome de dolor abdominal funcional, síndrome de vómitos cíclicos ni síndrome rumiante de adolescente.

Tabla 5.9. Alteraciones digestivas funcionales en los casos N=27 de la muestra total. Resultados del cuestionario Roma III-QPGS (The Questionnaire on Paediatric Gastrointestinal Symptoms)

	Roma I	Roma II	Roma III	Roma IV	Roma V	Roma VI	Roma VII	Roma VIII	Roma IX	Roma X
Casos (N=27) n (%)	0 (0)	5 (18,5)	4 (14,8)	2 (7,4)	0 (0)	13 (48,1)	2 (7,4)	10 (37)	1 (3,7)	0 (0)

Por protocolo, todos los controles presentaban Roma negativo.

Tomada la muestra total y como puede verse en la tabla 5.10, la beta-7-casomorfina se presenta en el 33 % de los casos (9/27) y en el 3,8 % de los controles (1/26) (tabla 5.10).

Tabla 5.10. Presencia de beta7-casomorfina en orina de pacientes y controles

	Casos (N=27)	Controles (N=26)	U	p
BCM (+) Número (%)	9 (33,3)	1 (3,8)	7,523	0,007

BCM(+): Presencia de beta-7-casomorfina

Tabla 5.11. Relación entre presencia de beta-7-casomorfina y edad en la muestra total

	BCM+ (N=10)		BCM- (N=45)		Valor estadístico	
	M	D.E.	M	D.E.	T	p
Edad	10,9	3,03	8,33	3,41	2,19	0,03

BCM+: Presencia de beta-7-casomorfina.

BCM-: Ausencia de beta-7-casomorfina.

No hay relación entre la edad de los sujetos y la presencia de beta-7-casomorfina.

Discusión de los resultados de la muestra total

El resultado de la muestra total es que no hemos conseguido replicar el hallazgo de la muestra preliminar analizada, ni tampoco detectar la beta-7-casomorfina en ningún individuo del grupo de casos y controles restante analizados en la segunda tanda del estudio. A pesar de que los resultados obtenidos a partir de la muestra total son significativos respecto a la presencia de beta-7-casomorfina en orina de pacientes con TEA y alteraciones digestivas funcionales, dados los problemas observados con la técnica, no podemos considerar estos resultados como válidos.

A la vista de estos resultados, la primera disyuntiva que se planteaba era la cuestión de si el resultado reflejaría la realidad de la ausencia de beta-7-casomorfina en orina o se trataría de un problema metodológico a la hora de detectarla. Trabajando en la hipótesis de que este resultado negativo fuese real, volvimos a analizar las orinas restantes que había de los sujetos que en la segunda fase habían resultado positivos, con la misma técnica. De nuevo todos los resultados fueron negativos. Por último, llamamos al paciente con un resultado más llamativo y recogimos una nueva orina y volvimos a realizar el análisis con la orina fresca, no sometida a los procesos de congelación y almacenamiento que habían tenido el resto de las muestras. De nuevo el resultado fue negativo. El hecho de que en la segunda fase del estudio pudiéramos ver el pico cromatográfico e identificar la bet-7-casomorfina por

secuenciación nos aseguraba que no se trataba de un falso positivo. Estas pruebas hicieron que nos decantáramos por un problema de técnica analítica en el origen de estos resultados tan contradictorios entre la segunda y la tercera fase del estudio.

Pasamos a analizar las posibles causas metodológicas de esta falta de reproducibilidad.

1.- Naturaleza de las muestras.

A. Concentración de la beta-7-casomorfina en las orinas

El orden de magnitud en el que hemos encontrado la beta-7-casomorfina en las orinas es de 0,1 ng/ml. Debido a que muchas de las moléculas que nos encontramos en la orina tienen una naturaleza similar, la separación cromatográfica previa resulta muy compleja. Esto se complica cuando estamos buscando péptidos que se encuentran en bajas concentraciones como ocurre posiblemente en nuestro caso, que pueden quedar enmascarados entre otros péptidos de naturaleza molecular similar y que se encuentran en concentraciones similares o superiores. La influencia del ruido en los análisis espectrométricos es tan grande que necesitamos concentraciones de las

sustancias a identificar suficientemente altas como para que los picos de detección se separen de la banda basal de ruido.

Dettmer y colaboradores (2007) en su estudio establecieron los límites mínimos de detección en las orinas contaminadas con beta-7-casomorfina estándar en aquellos picos cuya reproducibilidad daba una señal de 3 veces la señal de ruido (278). En cambio, Cass y colaboradores (2008) disminuyen este valor a 2,5 veces la señal de ruido (279). En nuestro caso, no hemos establecido un límite por encima del ruido para la detección de los picos esperados y se ha considerado todo pico presente y localizable a simple vista en el lugar esperado como susceptible de ser sometido a fragmentación.

Por otro lado, hay mucha diferencia en la muestra de orina en función de la recogida de la muestra que hagamos. En las orinas existe una amplia variación en la concentración de proteínas, debido, en parte, a diferencias en la ingesta diaria de líquido. Sin embargo, este factor puede ser contrarrestado por la normalización de la creatinina o de péptidos en general presentes en la orina (335). En el estudio de Cass aun cuando se toman los valores de creatinina en previsión de poder normalizar los valores de los resultados, finalmente no se utilizan. En nuestro estudio, al inicio del tratamiento de las orinas se tomó una muestra alícuota para el análisis de la creatinina y de la osmolaridad que se realizó en el laboratorio de bioquímica del Hospital. Estos análisis los hemos utilizado para mostrar que estadísticamente no hay una influencia de los valores de creatinina u osmolaridad sobre el resultado. Sin embargo, el hecho

de que en la muestra total se encuentre diferencias entre los grupos en estos parámetros, obliga a controlarlos en subsecuentes análisis.

Debido a la dificultad de la técnica que supone el que las concentraciones de beta-7-casomorfina sean posiblemente pequeñas, podríamos haber aumentado su concentración asegurándonos que los niños bebieran la noche anterior suficiente cantidad de leche como para asegurar un aumento de las concentraciones de este péptido en la orina.

B.-Degradación de péptidos en las orinas.

Muchos factores pueden hacer que se pierdan o se degraden las sustancias que contienen las orinas. El más importante probablemente sea la degradación enzimática. Algunas sustancias que se encuentran en la orina presentan actividad enzimática y otras son inhibidoras de las propias enzimas. De igual manera algunas enzimas se disocian en la orina en subunidades más pequeñas.

La actividad enzimática en la orina pudiera conducir a la escisión de moléculas en moléculas más pequeñas que pudieran interferir en mayor medida en la detección de la beta-7-casomorfina.

C.- pH

El pH puede influir en varios aspectos que podría tener consecuencias sobre los resultados de nuestra técnica. La variabilidad en el pH de las muestras puede alterar la actividad de las proteasas y por lo tanto llevar a una mayor variabilidad en la concentración o la composición de fragmentos peptídicos en particular. La degradación de las abundantes pequeñas fracciones de proteínas pueden ocultar las pequeñas señales de los péptidos.

Por otro lado, el pH puede variar la actividad bacteriana, con la diferente actividad enzimática derivada de ésta y por tanto la variabilidad molecular.

En tercer lugar, el pH puede variar el propio comportamiento molecular. Es decir, el comportamiento molecular de péptidos pequeños no es el mismo a distintos pH. Podrían interaccionar con otras moléculas más o menos grandes o pequeñas, por un lado y por otro podría modificarse su comportamiento en las columnas cromatográficas.

Suponemos que esta es la razón más importante que justificaría el uso de conservantes. Aunque también se podría plantear la estabilización de la muestra concretamente con un inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV.

En el estudio de Cass y colaboradores (2008) se valoró la estabilidad de la beta-7-casomorfina estándar en la orina patrón. En caso de no tratar las orinas mediante estabilización del pH y tras 12 horas a 20 °C, recuperaron sólo el 60% del péptido total. Pero cuando el pH de la orina se ajustaba a 2 y tras 20 horas a 10°C, se recuperaba el 100% y no parecía que sufriera degradación (279).

D.- Reproducibilidad de la técnica.

Las distintas tecnologías requieren diferentes procedimientos de preparación de la muestra. No se puede dejar de subrayar que la reproducibilidad de la preparación de la muestra es complicada. Por desgracia, cada paso adicional en la preparación de muestras es propensa a generar nuevos errores (336) e introducir elementos extraños, reduce la reproducibilidad y puede aumentar aún más la complejidad de las muestras. En nuestro caso, la preparación sigue una serie de pasos manuales sucesivos en los que podrían producirse errores o pérdida de péptidos.

E.- Contaminación de las columnas cromatográficas.

La posible contaminación de las columnas es también un factor a tener en cuenta. Esta contaminación, cuando todavía no es patente porque no se

observan síntomas objetivos, puede ser definitiva a la hora de analizar moléculas que se encuentran en trazas en la muestras. En estos casos estas moléculas se encuentran en muy pequeñas cantidades, rodeadas de un ambiente lleno de variedad de otras moléculas de la misma naturaleza y por tanto, de difícil separación.

F.- Ruido en Espectrometría

Aun cuando las técnicas espectrométricas son muy sensibles a la determinación de proteínas, la enorme complejidad de las orinas dificulta enormemente los análisis. La orina representa una mezcla muy compleja de moléculas de muy distinta polaridad, hidrofobicidad y tamaño. La naturaleza de estas sustancias puede ser muy diversa, encontrándonos sustancias como pigmentos y sales biliares que pueden enmascarar los péptidos a analizar y dificultar los análisis. Además podemos encontrar más de un millar de proteínas y péptidos en orinas normales humanas, habiéndose llegado a identificar 1543 proteínas en individuos sanos (334).

La beta-7-casomorfina parece encontrarse en concentraciones muy similares a las que se encuentran muchos péptidos cuya presencia es habitual en las muestras de orina. Este péptido se encuentra entre mucho ruido y en su fragmentación es complicado reconstruir la secuenciación.

Las técnicas de proteómica en el caso de la beta-7-casomorfina y en muestras de orina, dan resultados con mucho ruido y no concluyentes. En nuestro caso y además en nuestras muestras aparecía un anión de peso molecular muy similar al de la beta-7-casomorfina, lo cual dificultaba aún más los resultados.

Las técnicas espectrométricas están muy limitadas en el análisis de muestras complejas como la orina, por la existencia de ruido debido a la presencia de otras muchas moléculas que van a enmascarar las moléculas que estamos buscando identificar. Como ya hemos dicho, Dettmer y colaboradores establecieron en su estudio que iban a necesitar una mínima concentración de beta-7-casomorfina que diera una señal 3 veces mayor que la del ruido (278). Cass y colaboradores consideraron que necesitaban una señal de la beta-7-casomorfina mayor de 2,5 veces el ruido (279). Picos de menor altura consideraban que quedan sumidos dentro del ruido y no es posible identificar de qué molécula se trata.

Sin embargo, en nuestro estudio hemos podido identificar la beta-7-casomorfina probablemente por una mayor sensibilidad del método, LC MS/MS. Dado que la beta-7-casomorfina se encuentra en tan baja concentración, se decidió no valorar los límites de intensidad habituales, con una intensidad mayor de 1000 y con una relación respecto al ruido de 20, sino fragmentar aquellos picos visibles a simple vista y susceptibles de ser fragmentados en busca de la beta-7-casomorfina. En este caso no establecemos una relación señal/ruido como en los trabajos de Cass y Dettmer.

G.- Iones de peso molecular similar a la beta-7-casomorfina

Hay un ión muy próximo a la beta-7-casomorfina, ya que tiene un peso molecular muy similar. Este ión entorpece la secuenciación, porque en la fragmentación se mezclan los fragmentos de ambas moléculas. Para mejorar la separación de este péptido de la beta-7-casomorfina, hemos utilizado una cromatografía de intercambio catiónico.

H.- Congelación.

Aunque tuvimos mucho cuidado en la recogida de la muestra y en su rápida congelación, el tiempo desde que obtenemos la muestra hasta que la congelamos podría ser suficiente para que actúen las enzimas presentes en la orina. En el servicio de laboratorio de análisis del Hospital Gregorio Marañón, con amplia experiencia en investigación, el tiempo hasta la congelación suele ser breve y siempre por debajo de las recomendaciones. En el caso de no poder congelar de inmediato una muestra siempre quedaba refrigerada. No hay datos en la literatura para saber si pudo haber afectado a la estabilidad de la orina el tiempo que estuvo congelada la muestra.

La manera de la descongelación de las muestras no fue una descongelación controlada. Se hizo a temperatura ambiente y en cada caso a una distinta

temperatura; esto podría tener influencia sobre la rotura celular, con vertidos enzimáticos nuevos o alteraciones en el pH.

I.- La naturaleza del propio péptido frente a la técnica que estamos utilizando.

Las características de los péptidos respecto a su hidrofilia, su tamaño, su carga y su masa determinan la complejidad con la que se van a llevar a cabo las técnicas de separación e identificación. La beta-7-casomorfina es una molécula pequeña e hidrófila de modo que las eluciones van a ser muy rápidas, hasta el punto que no se puede asegurar la pérdida de una parte de la elución antes de su entrada en el espectrómetro.

En el estudio de Dettmer valoran la recuperación de la beta-7-casomorfina tras el paso por las columnas cromatográficas, de modo que se recuperó de las soluciones acuosas el 94 % de la beta-7-casomorfina, con una desviación estándar relativa (RSD) de entre el 2,5 y el 2,2%, y de las orinas contaminadas con el estándar recuperaron el 78-94%, con una RSD de entre 0,2% y 6,8% (278). Dadas la concentración de nuestra molécula en las muestras y las limitaciones de la técnica, esto podría suponer una menor capacidad de la detección de esta sustancia mediante esta técnica.

Por otro lado, su tamaño pequeño hace que una parte del péptido pueda perderse en el interior de las columnas cromatográficas de modo que no se recobre el 100% del péptido que se introdujo en la columna a la salida. Su carga, que se produce no sólo a nivel amino terminal, sino en cada uno de los grupos aromáticos de los aminoácidos prolina, hace que una parte de la fragmentación no sea detectable. Y por último su masa es muy pequeña para las técnicas proteómicas, donde los límites de detección habituales son de alrededor de los 1000 Dalton.

Cuando analizamos las muestras de orina decidimos no usar el espectrómetro de tipo MALDI que se había utilizado en la puesta a punto de la técnica y en su lugar nos decantamos por el LTQ. La razón de no elegir el espectrómetro de masas de tipo MALDI en esta segunda fase es que el péptido a detectar no es tríptico, es decir, no se digiere con tripsina, ya que los extremos carboxilo terminal no son lisina y arginina y el comportamiento de los iones no es el habitual en el trabajo de proteómica. Este péptido, al ionizarse presenta carga +1, +2, +3 o +4, mientras que un péptido tríptico va a presentar una carga de +2. La relación que se representa en espectrometría es de masa/carga, de modo que a mayor carga más cerca o por debajo del límite inferior de detección. El resultado es que las fragmentaciones de este péptido son de menor capacidad de resolución. Además, normalmente en proteómica se detectan péptidos de 1000 a 2000 Dalton de masa, de modo que un péptido de una masa molecular de 790 Dalton como la beta-7-casomorfina es considerado un péptido pequeño, que interfiere con la matriz del MALDI y no es fácil captarlo mediante esta técnica espectrométrica.

Las limitaciones del MALDI-TOF/MS son inherentes al proceso de ionización. En la identificación de péptidos bioactivos derivados de la leche hay que tener en consideración la importancia de las fuentes de ionización usadas para el análisis espectrométrico de estos compuestos en alimentos y en fluidos orgánicos (337). Las limitaciones que encontramos afectan a factores como la heterogeneidad de la muestra o matriz, a lo que se achaca la gran variabilidad en la intensidad de las señales obtenidas de los analitos, el limitado rango dinámico debido a saturación del detector y dificultades relacionadas con el acoplamiento del MALDI-TOF/MS a las técnicas de separación on line como la cromatografía líquida.

Conclusiones de los resultados de la muestra total

En conclusión, no podemos saber la razón de los resultados tan dispares obtenidos en la segunda y tercera fase del estudio. Sin embargo, el que los resultados positivos se interpreten visualmente y no haber podido replicar siquiera en las mismas muestras que inicialmente fueron positivas, ni en nuevas muestras tomadas de las mismas personas indica que es más posible la existencia de un problema en la metodología analítica que apunta en la dirección de escasa fiabilidad de esta técnica para los análisis que nos ocupan, con la obtención de resultados falsos negativos.

Todo esto nos lleva a poder decir que procede continuar investigando en busca de otros métodos para la determinación de beta-7-casomorfina en la orina de niños con TEA y se abre la necesidad de establecer nuevos caminos de investigación en este campo, como por ejemplo mediante técnicas inmunológicas.

A modo de resumen podemos decir que los resultados principales de este estudio son los siguientes:

1) Hemos conseguido desarrollar una técnica de identificación de beta-7-casomorfina en orina. La primera aportación de este estudio consiste en haber detectado beta-7-casomorfina en orinas contaminadas en concentraciones de 0,1 ng/ml, frente a las detectadas hasta ahora de 250 ng/ml (278), 2500 veces superior a la sensibilidad reportada.

2) Hemos conseguido detectar mayor presencia de beta-7-casomorfina en orina de pacientes con autismo y alteraciones digestivas funcionales, comparado con un grupo control de la misma edad y sexo, en una muestra preliminar de 14 sujetos.

3) No hemos conseguido replicar el hallazgo de la muestra preliminar analizada, ni tampoco detectar la beta-7-casomorfina en ningún individuo del grupo de casos y controles analizados en la segunda tanda del estudio.

6.- IMPLICACIONES DEL ESTUDIO

1. Los resultados de este estudio reabren el debate sobre la posibilidad de identificar péptidos procedentes de la dieta en orina de sujetos con autismo.
2. Los resultados de este estudio dan una idea del orden de magnitud en el que se encuentra la beta-7-casomorfina en la orina de los niños con TEA, de modo que se sientan las bases para poder establecer el análisis de este péptido mediante técnicas más adecuadas.
3. Los resultados de este estudio apoyan la identificación de un subgrupo de pacientes dentro de los TEA susceptibles de un abordaje dietético específico.
4. Los resultados de este estudio podrían apoyar la recomendación de dietas especiales en pacientes con TEA y patología digestiva asociada (recomendación que en la actualidad se realiza en algunas poblaciones, sin una evidencia científica que lo avale).
5. Los resultados del estudio podrían tener, según se ha descrito, aplicación clínica a medio plazo, con una importante repercusión en la salud de los pacientes con TEA y en el conocimiento de su enfermedad.

6. Los resultados de este estudio van a ser la base de nuevas líneas de investigación en relación a la intervención dietética.

7.- CONCLUSIONES

Se puede identificar el péptido exógeno beta-7-casomorfina en orina de un subgrupo de sujetos con trastorno del espectro autista que presentan de forma concomitante alteraciones digestivas funcionales, en mayor frecuencia que en controles pareados por edad y género, sin TEA ni alteraciones digestivas.

Las alteraciones digestivas funcionales que aparecen en autismo son de forma mayoritaria alteraciones intestinales, no habiéndose detectado en la muestra de este estudio alteraciones que impliquen disfunción esofágica o gástrica.

El hallazgo de beta-7-casomorfina en un alto porcentaje de sujetos con autismo y alteraciones digestivas funcionales apoya el estudio de los efectos de dietas restrictivas en subgrupos de pacientes fenotípicamente homogéneos, con alteraciones digestivas, frente a estudios en población general de TEA cuyos resultados han sido básicamente negativos.

Los resultados de este estudio no nos permiten decir si la peptiduria es reflejo de una inadecuada absorción de péptidos exógenos, tóxicos para el organismo en algún momento del desarrollo, o es simplemente un epifenómeno de una disfunción inmunológica sistémica, que afecta tanto a la función barrera intestinal, produciendo la absorción de los péptidos, como a otros sistemas del organismo, produciendo otros efectos patógenos incluyendo algunos relacionados con la sintomatología autista. La presencia de péptidos exógenos en orina de sujetos con TEA y alteraciones digestivas funcionales indica bien

un aumento en la absorción de estos péptidos a nivel digestivo, lo que implicaría un estado de aumento de permeabilidad de la barrera intestinal, con entrada superior a la capacidad de degradación enzimática, o bien un déficit en la degradación de la beta-7-casomorfina a nivel de la pared intestinal.

La conclusión existente en la literatura de que no hay péptidos procedentes de la dieta en orinas de niños con TEA debe ser desestimada de momento. Las técnicas utilizadas hasta la fecha (técnicas proteómicas con sensibilidad baja para la detección de péptidos como la beta-7-casomorfina en muestras como la orina) son inapropiadas para adoptar la conclusión de la no presencia de este péptido en submuestras de sujetos con TEA.

Es necesario retomar la investigación de la peptiduria en autismo como posible evidencia de una vía fisiopatológica que implica dieta-sistema inmune-desarrollo cerebral, mediante metodologías adecuadas.

Los resultados obtenidos invitan a profundizar en la investigación del efecto de los péptidos procedentes de la dieta en el desarrollo cerebral, adoptando metodologías que impliquen el estudio de diversos sistemas de forma conjunta: funcionamiento de las enzimas de degradación de los péptidos exógenos, estudio de la función de la barrera intestinal, estudio del estatus inmunológico como causa o consecuencia de la inadecuada absorción de los péptidos y por

último, estudio de los efectos de los péptidos opiodes sobre el sistema nervioso central en el desarrollo.

Respecto a la metodología:

La identificación de la beta-7-casomorfina en orina es posible pero poco fiable mediante técnicas proteómicas de última generación, que acoplan sistemas cromatográficos a sistemas de identificación de proteínas basadas en la fragmentación de las mismas en función de su masa y carga y el posterior cotejo con bases de datos informatizadas de péptidos.

La orina es un material orgánico complejo, con múltiples sustancias sobrenadantes, donde la separación e identificación de péptidos de bajo peso molecular es difícil y difícilmente replicable.

Es necesario desarrollar métodos más sensibles de identificación de péptidos pequeños e hidrosolubles como la beta-7casomorfina.

8.- ANEXOS

ANEXO 1. CRITERIOS DEL MANUAL DIAGNÓSTICO Y ESTADÍSTICO DE LOS TRASTORNOS MENTALES).

Versión DSM-IV para el diagnóstico de trastornos generalizados del desarrollo, incluido trastorno autista

CRITERIOS DSM-IV-TR Trastornos Generalizados del Desarrollo	
Criterios para el diagnóstico del F84.0 Trastorno autista (299.00)	
A. Existe un total de 6 (o más) ítems de 1, 2 y 3, con por lo menos dos de 1 y uno de 2 y de 3:	
1. alteración cualitativa de la interacción social, manifestada al menos por dos de las siguientes características:	
(a) importante alteración del uso de múltiples comportamientos no verbales, como son contacto ocular, expresión facial, posturas corporales y gestos reguladores de la interacción social.	
(b) incapacidad para desarrollar relaciones con compañeros adecuadas al nivel de desarrollo.	
(c) ausencia de la tendencia espontánea para compartir con otras personas disfrutes, intereses y objetivos (p. ej., no mostrar, traer o señalar objetos de interés).	
(d) falta de reciprocidad social o emocional.	
2. alteración cualitativa de la comunicación manifestada al menos por una de las siguientes características:	
(a) retraso o ausencia total del desarrollo del lenguaje oral (no acompañado de intentos para compensarlo mediante modos alternativos de comunicación, tales como gestos o mímica).	
(b) en sujetos con un habla adecuada, alteración importante de la capacidad para iniciar o mantener una conversación con otros.	
(c) utilización estereotipada y repetitiva del lenguaje o lenguaje idiosincrásico.	
(d) ausencia de juego realista espontáneo, variado, o de juego imitativo social propio del nivel de desarrollo.	
3. patrones de comportamiento, intereses y actividades restringidos, repetitivos y estereotipados, manifestados por lo menos mediante una de las siguientes características:	
(a) preocupación absorbente por uno o más patrones estereotipados y restrictivos de interés que resulta anormal, sea en su intensidad, sea en su objetivo	
(b) adhesión aparentemente inflexible a rutinas o rituales específicos, no funcionales	
(c) manierismos motores estereotipados y repetitivos (p. ej., sacudir o girar las manos o dedos, o movimientos complejos de todo el cuerpo)	
(d) preocupación persistente por partes de objetos	
B. Retraso o funcionamiento anormal en por lo menos una de las siguientes áreas, que aparece antes de los 3 años de edad: 1 interacción social, 2 lenguaje utilizado en la comunicación social o 3 juego simbólico o imaginativo.	
C. El trastorno no se explica mejor por la presencia de un trastorno de Rett o de un trastorno desintegrativo infantil.	

Criterios para el diagnóstico del F84.5 Trastorno de Asperger (299.80)	
A. Alteración cualitativa de la interacción social, manifestada al menos por dos de las siguientes características:	
<ul style="list-style-type: none"> 1. importante alteración del uso de múltiples comportamientos no verbales como contacto ocular, expresión facial, posturas corporales y gestos reguladores de la interacción social 2. incapacidad para desarrollar relaciones con compañeros apropiadas al nivel de desarrollo del sujeto 3. ausencia de la tendencia espontánea a compartir disfrutes, intereses y objetivos con otras personas (p. ej., no mostrar, traer o enseñar a otras personas objetos de interés) 4. ausencia de reciprocidad social o emocional 	
B. Patrones de comportamiento, intereses y actividades restrictivos, repetitivos y estereotipados, manifestados al menos por una de las siguientes características:	
<ul style="list-style-type: none"> 1. preocupación absorbente por uno o más patrones de interés estereotipados y restrictivos que son anormales, sea por su intensidad, sea por su objetivo 2. adhesión aparentemente inflexible a rutinas o rituales específicos, no funcionales 3. manierismos motores estereotipados y repetitivos (p. ej., sacudir o girar manos o dedos, o movimientos complejos de todo el cuerpo) 4. preocupación persistente por partes de objetos 	
C. El trastorno causa un deterioro clínicamente significativo de la actividad social, laboral y otras áreas importantes de la actividad del individuo.	
D. No hay retraso general del lenguaje clínicamente significativo (p. ej., a los 2 años de edad utiliza palabras sencillas, a los 3 años de edad utiliza frases comunicativas).	
E. No hay retraso clínicamente significativo del desarrollo cognoscitivo ni del desarrollo de habilidades de autoayuda propias de la edad, comportamiento adaptativo (distinto de la interacción social) y curiosidad acerca del ambiente durante la infancia.	

Criterios para el diagnóstico del F84.9 Trastorno Generalizado-No Especificado	
Esta categoría debe utilizarse cuando existe una alteración grave y generalizada del desarrollo de la interacción social recíproca asociada a una alteración en las habilidades de comunicación verbal o no verbal, o cuando hay comportamientos, intereses y actividades estereotipados pero no se cumplen los criterios de un Trastorno Generalizado del Desarrollo específico, o Esquizofrenia, o Trastorno de Esquizotípico de la Personalidad o Trastorno de la personalidad por evitación._	

<p>El CIE-10 distingue 3 subcategorías dentro del “Autismo atípico”.</p> <p>MARCAR LA QUE CORRESPONDA:</p> <p>F84.10 Atipicidad en la edad de comienzo</p> <p>F84.11 Atipicidad sintomática</p> <p>F84.12 Atipicidad tanto en edad de comienzo como sintomática</p>					
<p>F84.1 Autismo atípico</p> <p>A. Presencia de un desarrollo anormal o alterado aparecido a los tres o después de los tres años de edad (el criterio es como el del autismo a excepción de la edad de comienzo).</p> <p>B. Alteraciones cualitativas en la interacción social recíproca o alteraciones cualitativas en la comunicación o formas de comportamiento, intereses o actividades restrictivas, repetitivas y estereotipadas (el criterio es como para el autismo a excepción de que no es necesario satisfacer los criterios en términos del número de áreas de anormalidad).</p> <p>C. No se llega a satisfacer los criterios diagnósticos de autismo (F84.0).</p> <p>El autismo puede ser atípico tanto en la edad de comienzo (F84.11) como por sus manifestaciones clínicas (F84.12). <i>Un quinto dígito permite diferenciarlos con fines de investigación. Los síndromes que no puedan incluirse en uno de ellos se codificarán como F84.12.</i></p>					
<p>F84.10 Atipicidad en la edad de comienzo</p> <p>A. No se satisface el criterio A del autismo (F84.0). Esto es, la anomalía del desarrollo se manifiesta sólo a los tres años de edad o con posterioridad.</p> <p>B. Se satisfacen los criterios B y C del autismo (F84.0).</p>					
<p>F84.11 Atipicidad sintomática</p> <p>A. Satisface el criterio A del autismo (es decir, anomalía del desarrollo de comienzo antes de los tres años de edad).</p> <p>B. Alteraciones cualitativas en las interacciones sociales que implican reciprocidad, o en la comunicación, o bien formas de comportamiento, intereses y actividades restringidas, repetitivas y estereotipadas. Los criterios son similares a los del autismo excepto en que no hacen referencia a número determinado de áreas afectadas por la anormalidad.</p> <p>C. Se satisface el criterio C del autismo [Pie de página].</p> <p>D. No se satisface el criterio B del autismo (F84.0).</p> <p>Especificar:</p> <table border="1"> <tr> <td>Existencia de alteración en HH. de comunicación.</td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Existencia de patrones restringidos, repetitivos y estereotipados del comportamiento, intereses o actividades...</td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> </table>		Existencia de alteración en HH. de comunicación.	<input type="checkbox"/>	Existencia de patrones restringidos, repetitivos y estereotipados del comportamiento, intereses o actividades...	<input type="checkbox"/>
Existencia de alteración en HH. de comunicación.	<input type="checkbox"/>				
Existencia de patrones restringidos, repetitivos y estereotipados del comportamiento, intereses o actividades...	<input type="checkbox"/>				
<p>F84.12 Atipicidad tanto en edad de comienzo como sintomática</p> <p>A. No se satisface el criterio A del autismo. La anomalía del desarrollo se manifiesta sólo a los tres años de edad o con posterioridad.</p> <p>B. Alteraciones cualitativas de las interacciones que implican reciprocidad o de la comunicación, intereses y actividades restringidas, repetitivas y estereotipadas. Los criterios son similares a los del autismo excepto en que no hacen referencia a un número determinado de áreas afectadas por la anormalidad.</p> <p>C. Se satisface el criterio C del autismo.</p> <p>D. No se satisface el criterio B del autismo (F84.0).</p>					

Criterios del manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales DSM-5 para el diagnóstico del trastorno del espectro autista.

Trastorno del Espectro del Autismo. DSM 5	
Se deben cumplir los criterios A, B, C y D	
A. Déficits persistentes en comunicación e interacción social a lo largo de diferentes contextos, que no se explica por retrasos evolutivos de carácter general y se manifiesta en todos los síntomas siguientes:	
1. Dificultades en reciprocidad socio-emocional; rango de comportamientos que van desde mostrar acercamientos sociales inusuales y problemas para mantener el flujo normal de ida y vuelta de las conversaciones, pasando por un reducido interés por compartir intereses, emociones y afecto y responder a ellos, hasta una falta total de iniciativa en la interacción social.	
2. Déficits en conductas comunicativas no verbales usadas en la interacción social; rango de comportamientos que van desde mostrar una marcada dificultad para integrar conductas comunicativas verbales y no verbales, pasando por anomalías en el contacto visual y el lenguaje corporal, o déficits en comprender y usar la comunicación no verbal, hasta una falta total de expresividad emocional o gestual.	
3. Dificultades para desarrollar y mantener relaciones apropiadas al nivel de desarrollo (más allá de aquellas desarrolladas con los cuidadores); rango de comportamientos que van desde dificultades para ajustar el comportamiento en diferentes contextos sociales, pasando por dificultades para compartir juegos de ficción y hacer amigos hasta una ausencia aparente de interés en la gente.	
B. Patrones repetitivos y restringidos de conducta, actividades o intereses, que se manifiestan en, al menos dos de los siguientes síntomas:	
1. Conductas verbales, motoras o uso de objetos estereotipados o repetitivos (e.g. movimientos motores estereotipados, ecolalia, uso repetitivo de objetos, frases idiosincrásicas).	
2. Adherencia excesiva a rutinas, patrones de comportamiento verbal y no verbal ritualizado o resistencia excesiva a los cambios (e.g. rituales motores, insistencia en comer siempre lo mismo o seguir siempre el mismo camino, preguntas repetitivas o malestar extremo ante pequeños cambios).	
3. Intereses restringidos, intereses obsesivos que son anormales por su intensidad o el tipo de contenido (e.g. apego excesivo o preocupación excesiva con objetos inusuales, intereses excesivamente circunscritos o perseverantes).	
4. Hiper- o hipo-reactividad sensorial o interés inusual en aspectos del entorno (e.g. indiferencia aparente al dolor,/calor/frío, respuesta aversiva a sonidos o texturas específicas, oler o tocar objetos en exceso, fascinación por las luces u objetos que giran).	
C. Los síntomas deben estar presentes en la infancia (pero puede que no se manifiesten por completo hasta que las demandas sociales excedan las limitadas capacidades).	
D. El conjunto de los síntomas limitan y alteran el funcionamiento diario.	

ANEXO 2 VACUNAS Y AUTISMO

TRABAJO DE WAKEFIELD

En este Anexo se pretende dejar claro que los trabajos de Wakefield y su relación con las vacunas fueron probablemente promovidos por intereses puramente económicos y otros intereses personales, sin haber aportado un respaldo científico. Estos trabajos han traído consigo una mala influencia que han provocado daños tanto en algunas de las líneas de investigación clínica de los TEA como en la opinión pública sobre vacunaciones.

Existen investigaciones periodísticas detalladas sobre el trabajo de Wakefield, realizadas por Brian Deer, periodista del Sunday Times, recogidas en la página de dicho autor (www.briandeer.com) y en el artículo de Artigas-Pallares se detallan los acontecimientos ocurridos en relación con este tema (Artigas-Pallares 2010).

Las malas prácticas científicas en los reclutamientos y conclusiones de los trabajos de este autor en relación a los TEA hacen que dichos estudios no tengan validez científica, ya que muchos de los intereses que movieron a este autor a realizar dichos trabajos no fueron meramente científicos, sino más bien económicos y probablemente de protagonismo. Por tanto, hemos decidido

añadir este Anexo al trabajo de tesis para aclarar este punto y debido a la polémica que ha supuesto y que por fin parece cerrada.

La conexión entre vacunas y autismo surge de la idea de que la fracción antisarampionosa podría provocar una enteropatía malabsortiva que facilitaría la absorción de neuropéptidos tóxicos. Esta idea se basa en tres estudios del equipo de Wakefield y colaboradores.

El primer estudio es sobre la enfermedad de Crohn (1993) que sugería el virus del sarampión podía ocasionar una vasculitis granulomatosa persistente responsable de la enfermedad de Crohn. En este estudio la mayoría de los pacientes de una muestra de enfermos de Crohn tenía resultados positivos para sarampión en pruebas de inmunohistoquímica, frente a ninguno en tuberculosis intestinal (338).

El segundo estudio concluyó que el riesgo relativo de niños vacunados frente a los no vacunados era mayor para desarrollar colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn por exposición precoz al sarampión (339). Las conclusiones de este trabajo quedaron en entredicho por la aparición de abrumadoras pruebas que contradecían rotundamente estos hallazgos de Wakefield (340). Posteriormente, mediante otra técnica inmunológica más sofisticada, se compararon muestras intestinales de pacientes con enfermedad de Crohn con muestras de cerebro de un paciente con panencefalitis esclerosante subaguda

(encefalitis lenta relacionada con el sarampión), concluyendo los resultados en la misma dirección de los estudios anteriores (341). Tras las primeras pruebas que contradecían los hallazgos de Wakefield (340) y debido a la contundencia de la críticas que recibieron los trabajos de Wakefield, el propio autor se retractó un año más tarde de su último estudio favorable sobre la implicación del sarampión en la enfermedad de Crohn, mediante un artículo donde ponía él mismo en evidencia la ausencia de indicios de infección en las muestras de sangre o tejido intestinal de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (342).

Poco tiempo después de haberse descartado la relación entre la vacuna del sarampión y las enfermedades inflamatorias intestinales, apareció en la revista Lancet un nuevo artículo de Wakefield que conmocionó el mundo científico y generó una enorme polémica. Se trataba del tercer estudio de 12 niños entre 3 y 10 años con diarrea crónica y dolor abdominal en los que tras un desarrollo normal apareció un deterioro cognitivo conductual con pérdida de lenguaje que los padres cronológicamente asociaron a la vacuna MMR en 8 niños, sarampión en 1 y otitis en 1. En todos los niños se observó una hiperplasia nodular linfóide y en algunos identificación del virus del sarampión (47). Tres meses después, la revista Lancet publicó una carta que decía que los niños investigados por Wakefield fueron referidos a los autores por “La Asociación de Niños Discapacitados Autistas”, que promovía denuncias contra la industria farmacéutica, para evaluarlos y poder asociarlos con las vacunas y puso en entredicho la ética de reclutamiento de dicho estudio (343).

En el año 2002 Uhlmann y colaboradores encuentran que 75 de 91 pacientes con un diagnóstico confirmado de hiperplasia linfonodular y enterocolitis, fueron positivos al virus del sarampión en los focos de la hiperplasia folicular reactiva del tejido intestinal (344). Esto dio soporte a las teorías que involucraban la vacuna del sarampión con el autismo, ya que se había identificado en una serie de pacientes con TEA e hiperplasia linfonodular ileocólica, remitidos por Wakefield, el virus del sarampión en el intestino.

Sin embargo en marzo del 2004, John Walker-Smith reconoce mediante una carta en el Lancet que se sabía que en el momento de la publicación del artículo de Wakefield de 1998, alguno de los padres de estos niños estaba envuelto en litigios contra los fabricantes de vacunas (345). Wakefield responde diciendo que en el momento del reclutamiento de los pacientes, no se sabía que ninguno de ellos estuviera en litigios, aunque en el momento en que los niños se sometieron a la ileoscopia, uno de los niños ya estaba en litigios. Wakefield sostiene que el único aspecto que puede hacer dudas en los resultados es que los padres tenían en ese momento una percepción de que había una relación temporal entre la vacunación y el inicio de los síntomas. Sin embargo, la lista de los niños para el reclutamiento fue facilitada por el abogado que posteriormente inició el litigio y el propio Wakefield estuvo envuelto en las pruebas que luego se presentaron durante el juicio.

En realidad, queda en entredicho la ética del reclutamiento, aunque el director del comité científico se posiciona en ese momento, sosteniendo que ellos están

satisfechos de cómo se desarrolló el reclutamiento de la población de este estudio (Hodgson 2004). Por otro lado 10 de los 13 autores originales del estudio se retractan de la interpretación del artículo publicado en “The Lancet” en 1998, pero siguen manteniendo la evidencia de la idea central de dicho estudio, que fue la descripción de una lesión que presentaban los niños reclutados, niños con autismo con problemas gastrointestinales y que se ha evidenciado por estudios posteriores del Centro Real de Gastroenterología Pediátrica (the Royal Free Centre for Paediatric Gastroenterology) y otros grupos (153). Estos autores se retractan en la interpretación diciendo que en el estudio no se consiguió establecer conexión alguna entre la vacuna MMR y los TEA puesto que los datos fueron insuficientes y mantienen en esta carta la creencia de la importancia de seguir investigando en esta línea, puesto que aunque no se sabía bien cuál es la naturaleza de estos cambios histológicos, los pacientes con TEA pudieran verse beneficiados en el reconocimiento y tratamiento de los problemas gastrointestinales observados (346).

Sin embargo, otro de los autores, el doctor Harvey gastroenterólogo de adultos, mantiene la interpretación del artículo original (347) y los tres autores restantes del artículo original Wakefield, Linnell y Harvey, sostienen en dicho trabajo que no se hizo una asociación causal con la vacuna MMR, sino que esta asociación la hicieron posteriormente en la prensa los abogados litigantes (348). Además en esta carta Wakefield, Linnell y Harvey, hacen referencia a la revisión de Jefferson y colaboradores (2003) (349) de 120 artículos en el que concluyen que encuentran evidencia de los efectos secundarios posteriores a la

inmunización, aunque en esta revisión explícitamente dicen que ellos no encuentran que las inmunizaciones estén asociadas con el autismo.

En el año 2004 la propia revista Lancet rectifica sobre el estudio de Wakefield publicado en el 1998 (350) por deficiencias metodológicas y éticas: "consideramos ahora que es el momento adecuado para retractarnos formalmente de la interpretación de los resultados del artículo: deseamos dejar claro que en dicho artículo no se establecía ninguna relación causal entre la vacuna triple vírica y el autismo, dado que los datos eran insuficientes".

Además de que se haya cuestionado la ética del reclutamiento, se han detectado problemas éticos en el consentimiento de los sujetos de estudio, desproporción de la invasividad de las pruebas realizadas y falsedad tanto en la interpretación de la relación causal que los padres establecían entre las vacunas y el inicio de los síntomas, como en los resultados de las biopsias de las muestras enterales.

Mercurio

Por otro lado los motivos de alarma sobre el contenido de mercurio en las vacunas aparecieron a partir de 1999, cuando la Food and Drug Administration (FDA) estadounidense sugirió que los niños podrían haber recibido una dosis

de hasta 187,5 microgramos de mercurio a partir del timerosal contenido en las vacunas. La preocupación partía de las intoxicaciones por pescado ocurridas años antes en Minamata. Las recomendaciones hacían referencia al metilmercurio, pero no había ninguna recomendación para el etilmercurio, mucho menos peligroso, pues se elimina más rápidamente del organismo. Así que en 1999 la FDA, basándose en el principio de precaución, envía una carta a los fabricantes de vacunas requiriendo planes para la eliminación del timerosal de las vacunas o la justificación para seguir utilizando dicho compuesto como conservante, extrapolando la evidencia del metilmercurio: “los niveles de timerosal no son perjudiciales para los niños, pero la reducción de estos niveles hará las vacunas todavía más seguras”.

La Academia Americana de Pediatría y el Servicio de Salud Pública Americana emitió también un comunicado ese mismo año llamando a la eliminación del timerosal de las vacunas infantiles. La Agencia Europea de Evaluación del Medicamento (EMA) publicó un comunicado en 1999 promoviendo el uso de vacunas infantiles sin timerosal y en el 2001 publicó un documento sobre los aspectos a considerar en la reducción, eliminación o sustitución del timerosal en las vacunas.

Posteriormente se planteó la implicación del mercurio en el autismo a partir de un artículo en la revista “Medical Hypotheses”, donde Redwood y Bernad (2001) analizaban los síntomas del autismo y hallaban una semejanza con los síntomas de la intoxicación por mercurio (trastorno del movimiento, alteración

del lenguaje y alteraciones psiquiátricas) (351). Ambas autoras tenían en común el hecho de tener un hijo un con autismo. Posiblemente, el citado artículo hubiera pasado desapercibido para la comunidad médica, dada el poco impacto de la revista donde se publicó y la discutible solidez científica del razonamiento, a no ser por el hecho de que el tema había despertado gran interés en algunos medios de comunicación.

Adicionalmente a los argumentos teóricos, pronto aparecieron argumentos epidemiológicos. Geier y Geier publicaron en 2003 sus primeras sospechas sobre la relación entre el timerosal y los trastornos del neurodesarrollo, basadas en una revisión estadística de los efectos adversos a las vacunas recogidos en la base de datos oficial referida a este aspecto. Los resultados del estudio pusieron en evidencia que la incidencia de autismo, trastornos del lenguaje y retraso mental era significativamente más alta tras la administración de vacunas que contenían timerosal que tras la vacunación con vacunas libres de timerosal (Geier and Geier 2003). Sin embargo, la fuente de información del estudio de Geier fue el “Vaccine Adverse Event Reporting System” (VAERS), una institución administrativa a disposición de todos los ciudadanos americanos, donde se puede notificar cualquier acontecimiento que se suponga que pueda estar relacionado con alguna vacuna. Al poco tiempo de la publicación de Geier y Geier, los epidemiólogos Goodman y Nordin demostraron que los datos del VAERS estaban claramente sesgados por la intención de poner una querrela judicial por daños a los fabricantes de vacunas (Goodman and Nordin 2006).

Paralelamente al debate científico, ha existido un debate judicial de gran magnitud. En Estados Unidos, entre los años 1999 y 2007 se habían recogido alrededor de 5.000 demandas de compensación de daños por la atribución del autismo a las vacunas. El total de las compensaciones económicas solicitadas se estima que ascendía a 2,5 billones de dólares (Sugarman 2007). Las demandas se basaron en tres posibles teorías: la vacuna MMR es responsable del autismo, el timerosal puede causar autismo y la combinación de la vacuna y el timerosal son la causa del autismo. El proceso judicial de las vacunas y el autismo ha terminado denominándose Omnibus Autism Proceeding, que agrupa las casi 5.000 familias demandantes y más de 2,5 billones de dólares y cuyo núcleo es el caso de Michelle Cedillo, una chica con autismo de 12 años. El juez George Hastings dictaminó el 12 de febrero de 2009 que el peso global de la evidencia era abrumadoramente contrario a las teorías planteadas por los demandantes.

Existe evidencia científica que demuestra que esta teoría de que el timerosal presente en las vacunas pueda provocar autismo, no es cierta. En el estudio de Thompson y colaboradores (2007) se estudian 1047 niños de 7-10 años, a los que se les realizan pruebas neuropsicológicas, valoración psiquiátrica, cuestionarios a los padres y maestros y valoración de la exposición al mercurio hasta los 7 meses de vida. En este trabajo no se encontró relación entre la exposición a timerosal y el desarrollo cognitivo (352).

En el estudio de Meilleur (2009) no se encontraron diferencias en la exposición al timerosal en sujetos con autismo sin/con regresión (353). En 2 intoxicaciones de mercurio en los 50 y 60 en Japón por consumo de pescado contaminado la exposición prenatal causaba bajo peso en el nacimiento, microcefalia, retraso del desarrollo, parálisis cerebral, sordera, ceguera y convulsiones, pero no autismo (354).

En Dinamarca se dejó de usar la vacuna con timerosal en 1990 pero la incidencia de autismo siguió aumentando en igual proporción que en otros países (355). Similar experiencia en California tras dejar de vacunar con vacunas con timerosal en 2001 (356). En Japón solo se usó la MMR entre 1989 y 1993, sin diferencias en la incidencia de autismo en los periodos de inmunización y no inmunización (357).

Tampoco se observaron diferencias, en cuanto a la tasa de niños vacunados, mediante la comparación de 1.294 niños diagnosticados de autismo con un grupo control de 4.460 en la base de datos de Reino Unido "General Practice Research Database". Curiosamente, la tasa de vacunados fue mayor en los controles que en los sujetos con autismo (82,1% por 78,1%), aunque la diferencia no fue significativa. Tampoco la edad en la cual habían recibido la vacuna los niños con autismo y los controles difería (358).

En el estudio de Hertz-Picciotto, con una muestra de la base de datos del estudio CHARGE, se compararon 452 niños (2-5 años) con TEA, de retraso en desarrollo y de desarrollo normal. No se observaron diferencias en niveles de mercurio tras ajustar el consumo de pescado (los niños con autismo consumían menos). En niños con empastes bruxistas o que comían chicle, se observaron niveles mayores de mercurio, pero no más incidencia de autismo (39).

Otros estudios mantienen estos hallazgos. Lazoff y colaboradores (2010) estudiaron 23.365 niños para evaluar el impacto de la retirada de timerosal en la prevalencia del autismo desde 1996 y no observaron relación alguna (359). Madsen y colaboradores (2002) realizaron un estudio de una cohorte retrospectiva de 537.303 niños nacidos entre 1991-1998 en Dinamarca y no encontraron aumento del riesgo (360). Smeeth y colaboradores (2004) realizaron un estudio caso control en el Reino Unido de 1010 casos y 3671 controles ajustados por edad, sin encontrar asociación (358).

Desgraciadamente, haber recurrido a maniobras poco éticas y legales ha hecho que durante un tiempo la investigación en este campo se haya mantenido en suspenso y haya una cierta connotación negativa a explorar este tipo de hipótesis. Sin embargo, las hipótesis gastro-inmuno-cerebrales del autismo siguen teniendo un lugar en el terreno de la investigación y debemos superar los problemas derivados de una polémica que ha trascendido el campo de lo científico.

POSIBLE EXPOSICIÓN AL MERCURIO PROCEDENTE DE LAS VACUNAS

Catálogo de Especialidades Farmacéuticas 2002 del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos.

Edad	Peso (1)	Vacuna	Timerosal (mcg)	Hg (mcg)	Exposición al Hg (2)	N (3)
0 meses	3,4	Hepatitis B	25	12,4	3,64	9
2 meses	5,3	Hepatitis B	25	12,4	2,33	6
2 meses	5,3	DTP	50	24,8	4,67	12
2 meses	5,3	Hepatitis B y DTP (4)	75	37,2	7,01	16
4 meses	7,2	DTP	50	24,8	3,44	9
6 meses	8	Hepatitis B	25	12,4	1,55	4
6 meses	8	DTP	50	24,8	3,11	8
6 meses	8	Hepatitis B y DTP (4)	75	37,2	4,65	12
18	11,4	DTP	50	24,8	2,17	5
TOTAL				136,4		
(1) Peso medio en Kg (percentil 50). (2) Exposición al mercurio (microg/Kg) en el día de la administración. (3) Número de veces que se supera el límite de la FDA 0,4 microg de Hg/Kg/día (4) Administración simultánea						

CONTENIDO DE MERCURIO EN VACUNAS. www.vaccinesafety.edu

			Vaccine Brand Name Manufacturer	Thimerosal (Conc)	Mercury mcg/0.5 ml
Anthrax	BioThrax		BioPort Corp	0	0
DtaP	Tripedia		sanofi pasteur	*	*
	Infanrix		GlaxoSmithKline	0	0
	DAPTACEL		sanofi pasteur	0	0
DtaP-HepB-IPV	Pediarix		GlaxoSmithKline	0	0
DTaP-IPV-Hib	Pentacel		sanofi pasteur	0	0
DTaP-Hib	TriHIBit		sanofi pasteur	*	*
DTwP	All Products			0.01%	25
DT	Diphtheria & Tetanus Toxoids Adsorbed USP	Multi-dose	sanofi pasteur	0.01%	25
		Single dose		*	*
Td	DECAVAC		sanofi pasteur	*	*
	Tetanus and Diphtheria Toxoids Adsorbe				
Tdap	ADACEL		sanofi pasteur	0	0
	Boostrix		GlaxoSmithKline	0	0
Tetanus Toxoid	Tetanus Toxoid Adsorbed USP		sanofi pasteur	0.01%	25
	Tetanus Toxoid Adsorbed Adult Use				
	Booster				
Hib	ActHIB		sanofi pasteur	0	0
	Hiberix		GlaxoSmithKline	0	0
	HibTITER		Wyeth-Ayerst	0	0
	PedvaxHIB (2)		Merck	0	0
Hib/HepB	Comvax (3)		Merck	0	0
Hepatitis A	Havrix		GlaxoSmithKline	0	0
	Vaqta adult/pediatric		Merck	0	0
Hepatitis B	Engerix-B preservative free		GlaxoSmithKline	0	0
	Recombivax HB preservative free		Merck	0	0
Hep A-B	Twinrix		GlaxoSmithKline	0	0
HPV	Cervarix		GlaxoSmithKline	0	0
	Gardasil		Merck	0	0
Influenza 2010/11 Formula	Afluria	multi-dose	CSL Limited	0,01%	24,5
		single dose		0	0
	Agriflu		Novartis	0	0
	Fluarix		GlaxoSmithKline	0	0
	FluLaval		GlaxoSmithKline	0.01%	25
	FluMist		MedImmune	0	0
	Fluvirin	multi-dose	Novartis	0.01%	25
		prefilled syringe		*	*
	Fluzone	5 mL vial	sanofi pasteur	0,01%	25
		No Preservative		0	0
IPV	IPOL		sanofi pasteur	0	0
Japanese Encephalitis	Ixiaro commercial military		InterCell Bio	0	0
Meningococcal	JE-Vax		sanofi pasteur	0.007%	
	Menactra		sanofi pasteur	0	0
	MENOMUNE-A/C/Y/W-135	multi-dose	sanofi pasteur	0.01%	25
		single dose		0	0
	Menveo		Novartis	0	0
MMR	M-M-R II		Merck	0	0
MMR-Varicella	ProQuad		Merck	0	0
Polio	IPOL		sanofi pasteur	0	0
Pneumococcal	Pneumovax 23		Merck	0	0
	Pneumovax 23		Merck	0	0
Rabies	RabAvert		Chiron	0	0
	IMOVAX		sanofi pasteur	0	0
Rotavirus	RotaTaq		Merck	0	0
Typhoid Fever	Typhim Vi		sanofi pasteur	0	0
	Vivotif		Berna Biotech	0	0
Varicella Zoster	Varivax		Merck	0	0
	Zostavax		Merck	0	0
Yellow Fever	YF-VAX		sanofi pasteur	0	0

1. A concentration of 1:10,000 is equivalent to a 0.01% concentration. Thimerosal is approximately 50% Hg by weight. A 1:10,000 concentration contains 25 mcg of Hg per 0.5 mL.* This product should be considered equivalent to thimerosal-free products. This vaccine may contain trace amounts (<0.3 mcg) of mercury left after postproduction thimerosal removal; these amounts have no biological effect. JAMA 1999;282(18) and JAMA 2000;283(16).

El nivel de exposición al mercurio al vacunar a un niño desde el nacimiento a los 18 meses según el cuadro de vacunaciones recomendado, puede ser cero o llegar a los 136,4 microgramos, según si se administraran las vacunas que contienen timerosal o no. Dependiendo de las vacunas empleadas y de los días de administración, se puede llegar a sobrepasar el límite de exposición recomendado por la FDA entre 4 y dieciséis veces.

ANEXO 3. PARÁMETROS DEL SISTEMA INMUNE

	Singh	Gupta	Mc Bride	Jyonouchi	Croonenberg	Malloy	Iwata	Corbett	Hranilovic	Mostafa	Saresella	Ashwood	Kaluzka	Kolevzon	Al-ayadhi	Ashwood	Malik	Mostafa	Suzuki
	1996	1998	1998	2001	2002	2006	2008	2007	2008	2008	2009	2010	2010	2010	2011	2011	2011	2011	2011
FN 1								M											
FHR-1								M											
C1q								M											
IL-1																	ND		
IL-1-a												M							
IL-1-b				M							ND								M
IL-1-RA					M														M
IL-2		m				ND					ND						ND		ND
IL-4	ND	M		ND		M											ND		ND
IL-5				ND		M										ND	ND		M
IL-6	ND	ND		M	ND						ND	M				M	M		
IL-7																	ND		ND
IL-8																M	ND		M
IL-10		ND		ND	ND						ND								
IL-12	M										ND								
IL-12p40				ND								M				M			
IL-12p70																			M
IL-13						M													M
IL-15																			ND
IL-17																			M
C D																	M		
Eotaxina												m							
FGFb																			ND
G-CSF																			ND
GM-CSF																M	ND		ND
GRO-a																			M
HGF																			ND
SICAM-I	ND																		
IFN-a	ND										ND								
IFN-g	M	m		ND	M							ND					ND		ND
LIF																			ND
MCP-1-a												m							
MIP-1b																			ND
N A																		M	
OP															M				
PDGF-BB													M						ND
PG															m				
P Bc12																	M		
RANTES												m							
TNF-a	I			M	ND						ND						M		ND
Selectina-L							M												
Selectina-P							M												
5-HT			M						M	M				M				M	
STNFRII				M															
STNFRII				M															
VEGF																			ND

Niveles de citoquinas de sujetos con TEA en comparación con controles

De los muchos trabajos en los que se ha estudiado la posible alteración de los parámetros inmunes en los TEA, se han seleccionado aquellos en los que se valoran los niveles de citoquinas y moléculas mediadoras en sangre porque consideramos que puede ser un punto de partida para considerar la alteración inmune que nos encontramos en esta patología.

Sin embargo y como ya hemos dicho, después de estudiar los datos muy despacio intentando valorar los puntos comunes de dichos trabajos para establecer coincidencias que nos lleven a conclusiones, hemos visto que existen grandes diferencias en los criterios de inclusión y el reclutamiento de los grupos de sujetos, la elección del tipo de muestras así como los distintos tratamientos y preparaciones de dichas muestras, la elección de los parámetros inmunes a analizar, las diferentes técnicas de análisis elegidas, y multitud de parámetros diferentes que hacen muy difícil llegar a puntos de encuentro entre los muy diversos trabajos.

Por tanto, hemos decidido centrarnos en aquellos trabajos que han tomado muestras sanguíneas para valorar los niveles de interleuquinas y moléculas intermediarias de situaciones proinflamatorias, que además han resultado ser la mayor parte de los estudios publicados. Los resultados parecen indicar que realmente existe una situación proinflamatoria, como se ha reflejado en este trabajo.

Con el fin de ayudar a la interpretación de dichos datos, hemos creado un glosario donde se da una idea de la función de cada uno de los parámetros que se han nombrado.

☐ Fibronectina 1. Proteína del complemento. Coadyuvante de la proteína C1q.

☐ FHR-1. Proteína del complemento muy relacionada con la respuesta de los neutrófilos.

☐ C1q. Proteína del complemento. Juega un papel en el reclutamiento de los monocitos. La C1q es un activador del complemento que para actuar debe unirse a los anticuerpos.

☐ IL-1. Interleuquina 1. Citoquina proinflamatoria. Es un mediador clave en la respuesta inflamatoria ocasionando fiebre, neutrofilia y producción de proteínas de fase aguda. Determina la aparición de fiebre, probablemente induciendo la síntesis de prostaglandina E en las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos del hipotálamo; a su vez la prostaglandina E actúa sobre el centro termorregulador. Sobre la médula ósea favorece la producción y liberación de neutrófilos. En el hígado incrementa la síntesis de proteínas de fase aguda.

La IL-1 es liberada por las células presentadoras de antígenos, macrófagos, monocitos y células dendríticas como respuesta a infecciones o cualquier tipo de lesión o estrés, en respuesta al factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) producido fundamentalmente por macrófagos. A nivel local tras la unión entre la célula presentadora de antígeno y el linfocito, la IL-1 activa la proliferación y diferenciación de las células T y B contribuyendo así a la respuesta específica. Se conocen tres formas de IL-1: IL-1-alfa, IL-1-beta e IL-1RA.

☐ IL-1-alfa. Citoquina proinflamatoria. Es mayoritariamente intracelular y termina adherida a la membrana con ciertos efectos paracrinós en el entorno de la célula secretora.

☐ IL-1-beta. Citoquina proinflamatoria. Es secretada a la circulación e interacciona con dos tipos de receptores, de tipo I y de tipo II. El IL-1-R de tipo I se encuentra sobre la mayoría de las células del cuerpo y parece ser el mediador de las respuestas clásicas de la IL-1. El IL-1-R de tipo II se encuentra sobre linfocitos B, neutrófilos, monocitos y células de la médula ósea.

☐ IL-1RA. Citoquina compensadora. Es inhibitoria sobre las otras dos formas, actuando como antagonista por impedir la unión de la IL-1-alfa y beta a sus respectivos receptores.

☐ IL-2. Interleuquina 2. Citoquina proinflamatoria. Es una citoquina producida por linfocitos T colaboradores Th1 que induce la activación y

proliferación de linfocitos T, B, macrófagos y células NK entre otras. Ejerce su función mediante la unión a su receptor presente en estas células, la IL-2R o CD25. La IL-2 es producida durante una respuesta inmune cuando un antígeno (sea una molécula o un microbio) es reconocido por receptores antigénicos por la célula presentadora de antígeno. La presentación y unión de un pequeño segmento del antígeno por el HMC a una célula T con su receptor como intermediario (TCR), estimula la secreción de IL-2 y al mismo tiempo, la expresión de receptores de IL-2 (IL-2R). La subsiguiente interacción de IL-2 con IL-2R estimula el crecimiento, diferenciación y supervivencia de las células citotóxicas. Bajo el efecto de la IL-2 la célula T sufre un crecimiento exponencial, que es el fundamento de la memoria inmunitaria.

La IL-2 actúa como factor de crecimiento de los linfocitos T, induce todos los tipos de subpoblaciones de linfocitos y activa la proliferación de linfocitos B. La IL-2 también regula la respuesta inmunitaria e interviene en la reacción inflamatoria estimulando la síntesis de interferón e induciendo la liberación de IL-1, TNF-alfa y TNF-beta. La IL-2 es necesaria para el establecimiento de la memoria inmunitaria celular, así como para el reconocimiento de autoantígenos y antígenos foráneos. Tiene una importante función en la regulación de las respuestas de los linfocitos T mediante su acción sobre los linfocitos T reguladores. Actúa sobre las mismas células que la producen o sobre células adyacentes lo que hace referencia a su función como factor de crecimiento y supervivencia autocrino y paracrino respectivamente.

☐ IL-4. Interleuquina 4. Citoquina proinflamatoria. Es la citoquina mejor caracterizada en la regulación de la respuesta inmune humoral producida por los linfocitos T colaboradores Th2. En pocas cantidades induce la secreción de las subclases de inmunoglobulina G: IgG1, IgG3 e IgG4. En excesiva cantidad induce la producción de IgE. Esta citoquina antagoniza las acciones biológicas de IFN-gamma, tales como la activación de macrófagos y el desarrollo de células citotóxicas, de modo que actúa sobre el balance Th1/Th2.

☐ IL 5. Interleuquina 5. Citoquina proinflamatoria. Es una interleuquina producida por los Linfocitos Th2 y los mastocitos. Sus funciones son estimular el crecimiento de las células B y aumentar la secreción de inmunoglobulinas. Actúa también como mediador en la activación de los eosinófilos.

☐ IL-6. Interleuquina 6. Citoquina proinflamatoria. Es una citoquina segregada por macrófagos, linfocitos T, células endoteliales y fibroblastos. Su liberación está inducida por la IL-1 y se incrementa en respuesta al TNF-alfa. Es un pirógeno endógeno que interviene en la producción de inmunoglobulinas, en la diferenciación de linfocitos B, activa a los linfocitos T citotóxicos, células plasmáticas, modula la hematopoyesis y es la responsable, junto con la IL-1, de la síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado.

☐ IL-7. Interleuquina 7. Estimula el crecimiento de linfocitos pro-B y pre-B de la médula ósea, así como la proliferación de linfocitos T inmaduros CD4 y

CD8 localizados en el timo. También actúa sobre los linfocitos T CD4 y CD8 maduros para estimularlos a proliferar, induciendo a producir IL-2 e IL-2R.

□ IL-8. Interleuquina 8. Citoquina proinflamatoria. Conocida también como proteína activadora de neutrófilos-1 (NAP-1). Su síntesis se realiza en monocitos, macrófagos, células dendríticas, fibroblastos, linfocitos T, células endoteliales, epiteliales y neutrófilos. In vitro, estas últimas células expresan IL-8 al ser estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) o con citoquinas proinflamatorias como IL-1 o TNF-alfa. Su función principal es la quimioatracción de las células fagocíticas desde el interior de los vasos hacia el sitio de la infección. La IL-8 es una de las principales citoquinas producidas por los neutrófilos, ejerce un efecto autocrino que los lleva a perpetuar su activación. Es un potente factor quimiotáctico de neutrófilos, regula la producción de proteínas de adhesión y amplifica la respuesta inflamatoria local. La IL-8 por medio de la degranulación de los neutrófilos, puede iniciar una cascada inmunoestimuladora que ayuda a convertir una respuesta innata en una respuesta específica.

□ IL-10. Interleuquina 10. Citoquina compensadora. También conocida como factor de inhibición de la síntesis de citoquinas (CSIF sus siglas en inglés). Presenta propiedades antiinflamatorias ya que es capaz de inhibir la síntesis de citoquinas proinflamatorias de los linfocitos T y los macrófagos.

Es una citoquina producida por monocitos, macrófagos activados, queratinocitos, linfocitos Th2, linfocitos T CD8 y células B activadas. Es un inhibidor de la síntesis de citoquinas proinflamatorias producidas por macrófagos y células dendríticas activadas y suprime la producción de TNF-beta, IL-1, IL-6 e IL-8. La IL-10 también inhibe la producción de IFN-alfa por los linfocitos T colaboradores Th1 y linfocitos T NK y por lo tanto participa en el control de reacciones inmunitarias innatas e inmunidad celular. También participa en la expresión de moléculas del HMC clase II de las células presentadoras de antígeno, necesario en el reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos T CD4.

☐ IL-12. Interleuquina 12. Citoquina proinflamatoria. Induce selectivamente el patrón de citoquinas Th1. Es producida en macrófagos, monocitos y otras células presentadoras de antígeno. La función de la IL-12 es activar las células T colaboradoras Th1 y estimular la producción y citotoxicidad de las células T citotóxicas y de las células NK. También estimula la producción de IFN-gamma. Tiene un efecto sinérgico con el TNF-alfa en la inducción de cantidades de IFN-gamma y activa a su vez la capacidad fagocítica de los macrófagos.

☐ IL-12p40. Sólo se expresa en los macrófagos y otras células presentadoras de antígenos después de la activación con productos microbianos.

☐ IL-12p70. Compuesto por dos subunidades IL-12p35 e IL-12p40. Se produce en los macrófagos activados y actúa como un factor de crecimiento celular.

☐ IL-13. Interleuquina 13. Citoquina compensadora. Es una citoquina que se produce en linfocitos T y cuyo papel fundamental es la regulación de la función de los monocitos y de las células B. Modula la producción de IL-1, TNF IL-8 y de la proteína inflamatoria del macrófago. Estimula el crecimiento y la diferenciación de las células B e inhibe las células Th1, así como la producción de citoquinas inflamatorias.

☐ IL-15. Interleuquina 15. Mediadora del crecimiento de las células T CD8 de memoria y de la proliferación de linfocitos NK.

☐ IL-17. Interleuquina 17. Citoquina proinflamatoria. Se ha identificado con enfermedades autoinmunes y es secretada exclusivamente por las células T activadas Th17. La unión de la IL-17 con su receptor en la membrana de las células estromales, endoteliales y monocitarias, conduce a la expresión de IL-1, IL-6, IL-8, TNF-alfa, GM-CSF. Estimula las células T para producir moléculas proinflamatorias como IL-1, IL-6, TNF-alfa, NOS-2 (óxido nítrico sintasa) y citoquinas. Esto promueve el reclutamiento de neutrófilos y favorece los efectos inflamatorios en ciertas enfermedades autoinmunes.

☐ Eotaxina. Citoquina proinflamatoria. Producida por el endotelio activado. Es una citoquina atrayente de eosinófilos.

☐ FGF básica. Factor de crecimiento fibroblástico. Este factor tiene dos formas, de las que una de ellas es la forma básica. Estimula la angiogénesis en los sitios de reparación tisular.

☐ G-CSF. Factor estimulante de colonias de granulocitos (Granulocyte Colony Stimulating Factor). Promueve la maduración de células precursoras de médula ósea a neutrófilos y su activación y liberación a torrente sanguíneo.

☐ GM-CSF. El factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos o GM-CSF (por sus siglas en inglés Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor). Se produce por macrófagos, mastocitos, células T, células B, células endoteliales, fibroblastos, adipocitos... y constituye una familia de glicoproteínas que modula la hematopoyesis y controla la proliferación, diferenciación y capacidad funcional de los progenitores hematopoyéticos, para formar granulocitos y monocitos con actividades frecuentemente superpuestas. Es además, regulador importante de la respuesta inmune y de la homeostasis tisular.

☐ GRO-a. Quimioquina o proteína quimioatrayente de monocitos, neutrófilos y linfocitos T.

☐ HGF. Factor de crecimiento de hepatocitos. Es una proteína cuya forma inactiva se activa en los tejidos dañados

☐ SICAM-I. Marcador temprano de la activación de linfocitos T.

☐ IFN. El interferón es una proteína producida naturalmente por el sistema inmunitario de la mayoría de los animales como respuesta a agentes externos, tales como virus y células cancerígenas. En la mayoría de los casos, la producción de IFN es inducida por otras citoquinas como IL-1, IL-2, TNF y MCSF, que son sintetizadas en respuesta a la aparición de virus en el cuerpo. Su metabolismo y excreción se produce principalmente en el hígado y riñones. Difícilmente atraviesan la placenta y la barrera hematoencefálica.

El IFN tiene 2 acciones básicas: por un lado evita la replicación vírica en células aún sanas e impide la replicación en células infectadas que aún no han sido destruidas por la acción vírica y por otro lado, favorece la destrucción de las células ya infectadas, activando los linfocitos T NK capaces de reconocer células infectadas por virus y eliminarlas.

En los seres humanos hay tres tipos principales de IFN: el IFN alfa, el IFN beta y el IFN gamma. El IFN alfa y beta son producidos por las células T, células B, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y osteoblastos entre otras y son importantes componentes de la respuesta antiviral. Estimulan a los macrófagos y a las células NK y son activas contra los tumores. El IFN-gamma participa en la regulación de las respuestas inmune e inflamatoria. Se produce en los linfocitos T colaboradores Th1 activados por antígenos y en los linfocitos T NK activados por microbios y su función es importante en la activación de los macrófagos, tanto en la respuesta inmunitaria innata como adaptativa. Potencia los efectos del interferón alfa y beta y envía leucocitos al punto de infección, dando como resultado inflamación. El IFN-gamma es el principal agente activador de los macrófagos, para eliminar bacterias que han sido fagocitadas. Este IFN es también importante en la regulación de la respuesta de los linfocitos T colaboradores Th2.

☐ IFN-alfa e IFN-beta. Son dos isomorfos de un solo tipo de interferón. Son producidos por linfocitos T y B, macrófagos y otras células. Estimulan macrófagos y linfocitos NK.

☐ IFN-gamma. Participa en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria. Se produce en células Th1 activadas para atraer leucocitos al lugar de la inflamación, estimular la fagocitosis de los macrófagos y regular la respuesta de los linfocitos Th2. Potencia los efectos de los IFN alfa y beta.

☐ LIF. Factor inhibidor de leucemia (Leucemia Inhibitory Factor). Producido por linfocitos Th2. Detiene a los leucocitos en el foco inflamatorio.

☐ MCP-1. Proteína quimioatrayente para monocitos-1. Induce la expresión de las integrinas requeridas para la quimiotaxis, ya que estas últimas intervienen en la unión de la célula a la matriz extracelular o en la unión célula-célula. La MCP-1 tiene acción sobre los monocitos, linfocitos T de memoria, basófilos y células NK, pero no tiene acción sobre neutrófilos y no los atrae. Induce la liberación de gránulos por las células NK y los linfocitos T citotóxicos y es potente inductora de la liberación de histamina por los basófilos.

☐ Neuroquinina A. Péptido liberado por las fibras nerviosas de la zona de la inflamación y que produce la degranulación de las células cebadas y vasodilatación.

☐ Osteopontina. Mediador de la inmunidad celular temprana, sintetizada por macrófagos. Interviene en la remodelación vascular.

☐ PDGF. Factor de crecimiento derivado de plaquetas. Platelet Derived Growth Factor. Factor de crecimiento que regula el crecimiento y la división celular. Destaca su importante papel en la angiogénesis

MCP-3. Quimioquina 3 específica monocitaria o CCL7. Producida por macrófagos. Atrae monocitos y regula la función de los macrófagos.

☐ Progranulina. Se une a los receptores del factor de necrosis tumoral interviniendo en la inflamación.

☐ PBcl-2. Protein B cell lymphoma 2. Proteína llamada así por su relación con los linfomas donde están afectados los linfocitos B. Son reguladores de la apoptosis y relacionados de esta manera con la regulación de la respuesta inmune a derivada de las células presentadoras de antígeno.

☐ RANTES. Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted, o CCL5. Es un mediador quimiotáctico para células T, eosinófilos y basófilos y juega un papel fundamental en el reclutamiento de linfocitos a los lugares de inflamación.

☐ TNF-alfa. Factor de necrosis tumoral alfa. Citoquina proinflamatoria. Produce fiebre y en el hígado estimula la respuesta aguda de la inflamación, activando la síntesis de proteína C reactiva y otros mediadores celulares. Además, durante el proceso inflamatorio y dentro de los mediadores que determinan el efecto sobre la coagulación, el TNF-alfa, reviste una particular importancia.

Puede ser liberada desde los primeros momentos de la respuesta inmune por las células dendríticas en respuesta a los tejidos dañados o microbios invasores. La liberación de TNF-alfa produce la activación local del endotelio vascular, liberación de óxido nítrico con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, que conduce al reclutamiento de las células inflamatorias, inmunoglobulinas y complemento, provocando la activación de los linfocitos T y B. También aumenta la activación y adhesión plaquetaria y probablemente la oclusión vascular sea la causa de la necrosis tumoral, de donde procede su nombre.

Las funciones del TNF se deben a su unión a 2 receptores celulares diferentes que se localizan en distintas células como neutrófilos, células endoteliales y fibroblastos. Estos receptores se encuentran en forma soluble en el suero y en el líquido sinovial y son el TNFRI y el TNFRII. Alternativamente, el TNFRI y el TNFRII pueden iniciar una cascada que provee resistencia contra la apoptosis. El TNFRI media la apoptosis, mientras que el TNFRII la activación del NF- κ B, un factor de transcripción que una vez activado estimula la expresión de genes implicados en una amplia variedad de procesos biológicos relacionados con los procesos inflamatorios, desarrollo de células del sistema inmune y crecimiento celular. La estimulación del TNF-alfa está relacionada con otros mediadores celulares como la IL-1 y endotoxinas bacterianas. El TNF provoca la activación de la producción de otros mediadores como las interleuquinas de la IL-1 a la IL-6.

☐ Selectina L. También llamado CD62L. Se expresa en la membrana de granulocitos, monocitos y la mayoría de los linfocitos. Su misión es la adhesión de las células inmunes al endotelio vascular.

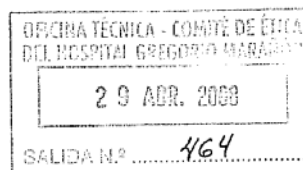
☐ Selectina-P. También llamada CD62P. Se expresa y almacena en gránulos citoplasmáticos en plaquetas y células endoteliales y se trasloca a la membrana al activarse la célula. Su función es reclutar células inmunes.

☐ 5-HT. Serotonina plaquetaria. Juega un papel muy importante en la modulación inmune y se ha visto aumentada en un 30% de los sujetos con TEA.

☐ TGF-beta. Citoquina compensadora poderosamente antiinflamatoria. Factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta). Es producida por una gran variedad de células como plaquetas, células endoteliales, linfocitos y macrófagos. Se une a dos receptores celulares de tipo I y II. El TGF-beta tiene muchos efectos diferentes, a veces opuestos, en función del tejido afectado y del daño sufrido. Sobre la mayoría de las células epiteliales, el TGF-beta es un inhibidor del crecimiento, ya que promueve la expresión de inhibidores del ciclo celular. El TGF-beta es un agente fibrogénico importante, que estimula la quimiotaxis hacia los fibroblastos y aumenta la expresión de colágeno, fibronectina y proteoglicanos. Además, disminuye la degradación del colágeno. Por todo ello, el TGF-beta está implicado en el desarrollo de fibrosis en

procesos de inflamación crónica. En tercer lugar, el TGF-beta tiene una fuerte acción antiinflamatoria ya que puede aumentar algunas funciones inmunes, controlando la proliferación de linfocitos T y diferenciación de linfocitos T colaboradores en linfocitos T colaboradores Th1 y Th2.

ANEXO 4. APROBACIÓN DEL COMITÉ CIENTÍFICO DEL HOSPITAL



Hospital General Universitario
Gregorio Marañón

Comunidad de Madrid



DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

D. Fernando Díaz Otero, Secretario del **COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA - ÁREA 1**

CERTIFICA

Que ha evaluado la propuesta del promotor referida al estudio:

TÍTULO: "Detección de Beta-7-Casomorfina en orina de pacientes con trastorno del espectro autista"

PROMOTOR: Investigador

considera que :

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos legalmente establecidos, y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Además, el citado CEIC cumple las normas de BPC (CPMP / ICH / 135 / 95).

Este CEIC acepta que dicho estudio sea realizado por los investigadores principales:

Dra. María José Parellada Redondo / Servicio de Psiquiatría / Hospital General Universitario Gregorio Marañón

Lo que firmo en Madrid, a 29 de abril de 2008

Fdo: Dr. Fernando Díaz Otero

N.E.:

C.I.: 51/08

C.P.:

C/ Dr. Esquerdo 46, Pabellón de Gobierno, Planta baja, 28007 Madrid
ceic.hugum@salud.madrid.org Tel. 91-586 70 07 – Fax. 91-400 81 56

COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN

En relación con la V Convocatoria para la adjudicación de Ayudas a la Investigación Médica 2008 de la Fundación Mutua Madrileña.

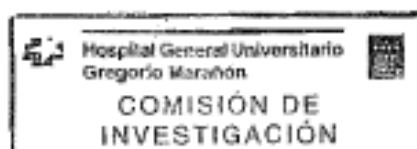
Le comunico que la Comisión de Investigación del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, de Madrid, en su reunión extraordinaria del día 24 de marzo de 2008, ha dado informe favorable a efectos de la presentación y viabilidad del proyecto titulado "Detección de Beta-7- Casomorfina en Orina de Pacientes con trastorno del Espectro Autista"

del que es Investigador Principal: Maria José Parellada Redondo

Lo que firma a los efectos oportunos en Madrid a 24 de marzo de 2008



Elena Dulín Iñiguez
Presidente de la Comisión





FUNDACIÓN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
HOSPITAL GREGORIO MARAÑÓN

D. Albino Navarro Izquierdo, como responsable legal y Gerente de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Gregorio Marañón (FIBHGM)

DECLARA

en relación con la V Convocatoria para la adjudicación de Ayudas a la Investigación Médica 2008 de la Fundación Mutua Madrileña, a la cual se presenta el proyecto titulado **"Detección de Beta-7- Casomorfina en Orina de Pacientes con trastorno del Espectro Autista"** cuyo investigador principal es la **Dra. Maria José Parellada Redondo**, que la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Gregorio Marañón conoce y acepta las bases de la citada convocatoria.


Madrid a 25 de marzo de 2008

Albino Navarro Izquierdo
Gerente de la FIBHGM

PABELLÓN DE GOBIERNO
Doctor Esquerdo, 46
28007 Madrid
Tel.: 914 008 155
Fax: 914 008 156

ANEXO 5. MODULO 3 DEL ADOS

ADOS



Módulo 3

Fluidez verbal
Niños y adolescentes

Datos de identificación

Nombre y apellidos del niño

Sexo: ☐ Varón ☐ Mujer

Fecha de evaluación: Año Mes Día

Fecha de nacimiento:

Edad cronológica:

Examinador:

Información adicional:

Observación y codificación

1. Tarea de construcción
2. Juego simbólico
3. Juego interactivo conjunto
4. Tarea de demostración
5. Descripción de una imagen
6. Contar un cuento de un libro
7. Viñetas
8. Conversación e informes
9. Emociones
10. Dificultades sociales y molestias
11. Descanso
12. Aislamiento y aislamiento
13. Soledad
14. Inventarse una historia

Observación

NOTAS

1. Tarea de construcción

Aspectos a observar: El objetivo de esta actividad es observar si el participante indica la necesidad de más piezas y, si es así, cómo lo hace (p. ej., ¿pasa por encima del brazo del examinador para agarrar él mismo las piezas?, ¿hace alguna vocalización o gesto o establece contacto visual?).

Muestra de comunicación:



Autores: C. Lord, M. Rutter, P. C. DiLavore y S. Risi.
Copyright original © 1999, 2001 by WPS, Western Psychological Services.
Copyright de la edición española © 2008 by TEA Ediciones, S. A. Madrid (España).
Todos los derechos reservados. Prohibida la reproducción total o parcial. Impreso en España. Printed in Spain.



2. Juego simbólico

Aspectos a observar: Esta actividad tiene como objetivo observar hasta qué punto el participante produce secuencias de acciones que impliquen el uso de materiales más allá de su intención más obvia. Se debe prestar una atención especial a cómo el participante maneja los muñecos como seres animados y a cómo representa que interactúan entre ellos.

3. Juego interactivo conjunto

Aspectos a observar: El objetivo de esta actividad es observar la reciprocidad mostrada por el participante en un juego interactivo. El objetivo es que el participante (y no el examinador) desarrolle la interacción y que brinde una iniciativa nueva que vaya más allá de una respuesta directa a las propuestas o acercamientos del examinador.

4. Tarea de demostración

Aspectos a observar: El objetivo de esta actividad es observar si el participante puede representar (y si es así, cómo lo hace) acciones familiares usando gestos, en particular si utiliza su cuerpo para representar un objeto (p. ej., un dedo como cepillo de dientes) o si simula el uso de un objeto imaginario. Además, el examinador debe considerar también el grado en que el participante puede (a) modificar adecuadamente el nivel de detalle al contexto actual y (b) narrar una acción que le es familiar.

5. Descripción de una imagen

Aspectos a observar: El objetivo es obtener una muestra del lenguaje y la comunicación espontánea del participante, además de poder ver qué es lo que le llama la atención.



**6. ▶ Contar un cuento de un libro**

NOTAS

Aspectos a observar: El objetivo de esta actividad, al igual que en la anterior, es obtener una muestra del lenguaje y de la comunicación espontánea del participante y una idea de lo que le interesa. Esta tarea también brinda una oportunidad para evaluar su respuesta al sentido del humor convencional y su comprensión de las indicaciones visuales del contexto social (p. ej., qué están haciendo los personajes en el cuento y cómo se están sintiendo).

7. ▶ Viñetas

Aspectos a observar: Los objetivos de esta tarea incluyen: (a) la observación del uso de gestos y su coordinación con el habla; (b) otra oportunidad para observar su respuesta al humor; (c) una oportunidad de tomar otra muestra de lenguaje; (d) formarse una opinión acerca del «insight» y la flexibilidad que puede llegar a tener el participante en adaptar una narración a su audiencia; (e) así como anotar cualquier comentario que pueda hacer acerca de los afectos y las relaciones.

8. ▶ Conversación e informes

Aspectos a observar: El objetivo es observar el grado en que el participante se basa en las afirmaciones del examinador y adopta un papel activo en la conversación (de «ida y vuelta»), especialmente acerca de un tema que no sea del contexto inmediato. Se debe prestar especial atención a cómo el participante informa acerca de los acontecimientos rutinarios y los no rutinarios y a cómo describe las relaciones y las emociones. Esta tarea ofrece, además, la oportunidad de observar las características de su comunicación, incluyendo el uso de la mirada, la expresión facial, la entonación y los gestos.





9. Emociones

Aspectos a observar: El objetivo de estas preguntas es doble: (a) identificar qué hechos u objetos producen distintas emociones en el participante, especialmente si son de naturaleza social o no, y (b) observar cómo describe sus emociones.

Preguntas de la entrevista:

- ¿Qué te gusta hacer que te haga sentir alegre y contento?
- ¿Qué tipo de cosas te hacen sentir de esta manera? ¿Cómo te sientes cuando estás alegre? ¿Lo puedes describir?
- ¿Qué cosas te dan miedo?
- ¿Qué te hace sentir miedo o te pone ansioso? ¿Cómo lo sientes? ¿Qué haces en esos casos?
- ¿Y qué hay de sentirte enfadado (molesto, enojado)?
- ¿Qué tipo de cosas te hacen sentir de esa manera? ¿Cómo te sientes «por dentro» cuando estás enfadado?
- La mayoría de las personas pasan por momentos en los que se sienten tristes. ¿Qué tipo de cosas te hacen sentir de esa manera?
- ¿Cómo te sientes cuando estás triste? ¿Cómo es para ti estar triste? ¿Puedes describirlo?

10. Dificultades sociales y molestias

Aspectos a observar: La atención aquí está puesta en la percepción que tiene el participante de las dificultades sociales, su comprensión con respecto a la naturaleza de estos problemas y si ha hecho algún intento por cambiar su propio comportamiento para adecuarse mejor a los que le rodean. Se debe prestar atención al grado de comprensión que tiene con respecto a las implicaciones de sus sentimientos y a si son adecuados o no.

Preguntas de la entrevista:

- ¿Alguna vez has tenido dificultades para llevarte bien con la gente en la escuela (o en el trabajo)?
- ¿Hay cosas que hacen los demás que te irritan o te molestan? ¿Cuáles son?
- ¿Alguna vez se burlaron de ti o te intimidaron de alguna manera? ¿Por qué piensas que lo hicieron?
- ¿Qué hay de las cosas que haces tú que molestan a los demás?
- ¿Alguna vez has intentado cambiar estas cosas? ¿Alguna vez has hecho algo para que los demás no se burlien de ti? ¿Funcionó?

11. Descanso

Aspectos a observar: Son varios los factores a observar: (a) cómo el participante se mantiene ocupado durante el tiempo libre que tiene, (b) cómo responde al hecho de que se haya retirado el examinador de la interacción y (c) si inicia y participa en una conversación o interacción no estructurada con el examinador y cómo lo hace.





12. Amistades y matrimonio

NOTAS

Aspectos a observar: Este conjunto de preguntas no pretenden determinar si el participante tiene amigos o no, sino saber cómo entiende el concepto de amistad y matrimonio, la naturaleza de estas relaciones y cómo ve su propio rol en ellas. Las preguntas sobre el matrimonio y las relaciones a largo plazo también están destinadas a averiguar cuál es la comprensión que tiene de por qué una persona quiere formar parte de una relación de este tipo y su comprensión sobre cuál sería su posible rol en ellas.

Preguntas de la entrevista:

- ¿Tienes amigos? ¿Puedes contarme algo sobre ellos? (Anotar las edades de los amigos. Puede ser útil pedirle que especifique sus nombres si el participante habla muy en general sobre quiénes son sus amigos).
- ¿Qué les gusta hacer juntos? ¿Cómo los llegaste a conocer? ¿Con qué frecuencia se juntan?
- ¿Qué significa para ti ser un amigo?
- ¿Cuál es la diferencia entre un amigo y alguien que simplemente conoces o con quien vas a la escuela?
- ¿Tienes novio (novia)? ¿Cómo se llama? ¿Cuántos años tiene?
- ¿Cuándo fue la última vez que se vieron?
- ¿Cómo es? ¿Qué les gusta hacer juntos?
- ¿Cómo sabes que es tu novio (novia)?
- ¿Has pensado alguna vez en tener una relación a largo plazo o casarte (cuando seas más mayor)?
- ¿Por qué piensas que algunas personas se casan cuando son mayores?
- ¿Qué es lo bueno de casarse? ¿Qué es lo que puede llegar a ser difícil de casarse?

13. Soledad

Aspectos a observar: Estas preguntas sirven para averiguar si el participante comprende el concepto de soledad y cómo la siente referida a él.

Preguntas de la entrevista:

- ¿A veces te sientes solo?
- ¿Piensas que otras personas (jóvenes) en tus mismas circunstancias alguna vez se sienten solas?
- ¿Hay algo que hagas para sentirte mejor?

14. Inventarse una historia

Aspectos a observar: Esta actividad se centra en el uso creativo que hace el participante de los objetos, contando una historia original o creando un tele-diario o un anuncio publicitario.





Codificación

Los códigos generales que se asignan en esta sección deberán completarse de acuerdo con el comportamiento mostrado por el niño a lo largo de toda la sesión de evaluación. Si su comportamiento cambia cualitativamente después de un período de adaptación, los códigos deberán basarse en el período posterior, donde ya se ha estabilizado el comportamiento. Los códigos deberán asignarse inmediatamente después de la evaluación. Los códigos se organizan de acuerdo a cinco agrupaciones principales: «A. Lenguaje y comunicación», «B. Interacción social recíproca», «C. Imaginación», «D. Comportamientos estereotipados e intereses restringidos», y «E. Otros comportamientos anormales».

A. Lenguaje y comunicación

A menos que se indique lo contrario, se debe codificar el comportamiento con relación a lo esperado a su edad cronológica, no en comparación con su nivel de desarrollo o sus habilidades estimadas de lenguaje expresivo.

1. Nivel general de lenguaje no ecológico

El código que se asigne debiera ser un reflejo de la mayoría de las verbalizaciones, no meramente de las mejores.

- ☐ 0 = Utiliza oraciones generalmente de forma correcta (debe utilizar algunas verbalizaciones complejas de dos o más cláusulas).
- ☐ 1 = Cierta complejidad del habla (en ocasiones utiliza verbalizaciones de dos o más cláusulas) pero con errores gramaticales recurrentes.
- ☐ 2 = El habla no ecológica se compone principalmente de verbalizaciones de, por lo menos, 3 o más palabras, pero las frases simples no son elípticas¹.
- ☐ 3 = El habla no ecológica consiste principalmente en frases simples.

2. Anormalidades del habla asociadas con autismo (entonación/volumen/ritmo/velocidad)

Este ítem se centra en las anomalías del habla específicas del autismo. Debido a la variación que existe dentro del espectro autista, los patrones del habla que son inusuales de acuerdo con las características identificadas, pero que no son prototípicamente autistas, se deberán codificar como «1». Realice la valoración de acuerdo con el nivel de lenguaje expresivo del individuo. Patrones anormales del habla típicamente asociados con retrasos del lenguaje se deberán codificar como «0».

- ☐ 0 = Entonación que varía apropiadamente, volumen razonable y velocidad normal del habla, con un ritmo regular coordinado con la respiración.
- ☐ 1 = Poca variación de timbre y tono; más bien monótono o exagerado, pero sin una entonación claramente peculiar; O tiene un volumen levemente inusual; O tiene un habla que tiende a ser inapropiadamente lenta o rápida o espasmódica (como a saltos).
- ☐ 2 = Habla claramente anormal debido a cualquiera de las siguientes razones: ser lenta y vacilante; inapropiadamente rápida; espasmódica (como a saltos) y con un ritmo irregular (sin que se incluya aquí el tartamudeo típico) de tal manera que existe alguna dificultad para entenderlo; entonación rara o timbre o acento inapropiado; marcadamente monótona y sin entonación («habla mecánica»); volumen consistentemente anormal.
- ☐ 3 = Tartamudeo u otro trastorno de la fluencia verbal.
- ☐ 8 = N.a. (el habla no se da con la suficiente frecuencia o complejidad como para evaluar entonación/ritmo/velocidad).

3. Ecolalia inmediata

La ecolalia inmediata se define como repeticiones del habla del examinador u otra persona que se dan inmediatamente después de la última afirmación o serie de afirmaciones por parte del adulto. No se incluyen aquí las repeticiones de afirmaciones que conducen a una respuesta a una pregunta del examinador o que se utilizan como técnica mnemotécnica en tareas específicas.

- ☐ 0 = Rara vez o nunca repite el habla de otra persona.
- ☐ 1 = Eco ocasional del habla de otros.
- ☐ 2 = Repite palabras o frases con regularidad, pero también posee lenguaje espontáneo (puede ser estereotipado).
- ☐ 3 = El habla consiste principalmente en ecolalia inmediata.

4. Uso estereotipado o idiosincrásico de palabras o frases

Aquí se incluye la ecolalia demorada y otras vocalizaciones altamente repetitivas con patrones de entonación uniformes, así como también el uso de palabras o frases excesivamente formales. Estas palabras o frases pueden tener una intencionalidad y pueden ser apropiadas a la conversación en algún nivel. La atención está centrada en la cualidad estereotipada o idiosincrásica de sus frases, en el inusual uso de palabras o formación de vocalizaciones o en su asociación arbitraria con algún significado en particular. Los neologismos deberían codificarse dentro de este ítem, así como la evidencia clara de errores en el uso de los pronombres personales (p. ej., «tú» o «él/ella» que en realidad quieren decir «yo»). Realice la valoración de acuerdo al nivel de lenguaje expresivo del individuo.

- ☐ 0 = Rara vez o nunca usa palabras o frases estereotipadas o idiosincrásicas.
- ☐ 1 = El uso de palabras o frases tiende a ser más repetitivo o formal que en la mayoría de los individuos con el mismo nivel de complejidad, pero no es claramente raro; U ocasionalmente produce vocalizaciones estereotipadas o hace uso de palabras raras o emplea frases de forma inusual, junto con otro lenguaje espontáneo flexible.
- ☐ 2 = A menudo emplea vocalizaciones estereotipadas o palabras o frases raras, ya sea con presencia o no de otro lenguaje.
- ☐ 3 = Las frases son casi exclusivamente vocalizaciones raras o estereotipadas.

1. Nota del traductor: Elíptico: Perteneciente o relativo a la elipsis. Elipsis: Figura de construcción que consiste en omitir en la oración una o más palabras necesarias para la recta construcción gramatical pero no para que resulte claro el sentido.

5. Ofrece información

Este ítem se centra en el ofrecimiento espontáneo y apropiado por parte del participante de información personal que resulte nueva para el examinador. No tiene que suceder dentro de un contexto determinado ni ser parte de una interacción sostenida. Puede suceder como elaboración o respuesta a alguna pregunta, pero debe incluir información nueva, que no esté especificada en la pregunta. Puede estar relacionada con los intereses del participante pero no puede estar relacionada exclusivamente con sus preocupaciones. Los comentarios generales acerca de hechos (como por ejemplo, «¿sabías que las ballenas son mamíferos?») no se codifican aquí, pero se pueden considerar como parte de la valoración de «conversación» más adelante. Los comentarios acerca de relaciones o posesiones (p. ej., «tengo dos hermanos» o «nuestra familia tiene un barco») se pueden codificar aquí si se refieren a una actividad y no es simplemente una lista de características.

- ☐ 0 = En varias ocasiones ofrece información espontánea sobre sus pensamientos, sentimientos o experiencias.
- 1 = Ocasionalmente ofrece información de manera espontánea sobre sus pensamientos, sentimientos o experiencias.
- 2 = Rara vez o nunca ofrece información de forma espontánea a menos que sea de sus intereses circunscritos o preocupaciones; O informa acerca de hechos o conocimientos generales, incluyendo las preocupaciones o intereses circunscritos.

6. Pide información

La atención de este ítem está centrada en la expresión de interés espontáneo por parte del participante en las ideas, conocimientos, experiencias o reacciones del examinador. Este interés no debe ser parte de una preocupación. No se incluye dentro de este ítem el pedir información que no esté relacionada con el examinador, que sea sobre los materiales del ADOS o que verse sobre hechos particulares no específicos al examinador; estas conductas en cambio sí deben tenerse en cuenta a la hora de codificar el ítem de «conversación». En este ítem las preguntas no tienen que llevar necesariamente a una conversación sostenida. Las preguntas sobre relaciones o posesiones se pueden incluir aquí si se refieren a una actividad y no simplemente a completar una lista.

- ☐ 0 = Le pregunta al examinador sobre sus pensamientos, sentimientos o experiencias en varias ocasiones.
- 1 = Ocasionalmente (por lo menos un ejemplo claro) le pregunta al examinador sobre sus pensamientos, sentimientos o experiencias.
- 2 = Responde adecuadamente a los comentarios hechos por el examinador acerca de sus pensamientos, sentimientos o experiencias, pero espontáneamente no hace preguntas sobre ellos.
- 3 = Rara vez o nunca le pregunta al examinador acerca de sus pensamientos, sentimientos o experiencias, ni expresa interés por ellos.

**7. Narración de sucesos**

La atención de este ítem está centrada en la habilidad del participante para elegir un hecho o circunstancia, espontáneamente o en respuesta a las preguntas generales del examinador, y describirlo de manera comprensible sin necesitar preguntas específicas para guiarlo. Debe implicar una descripción secuencial de un hecho fuera del contexto inmediato. Codifique el «mejor» ejemplo, teniendo en cuenta las restricciones con respecto a las preocupaciones y a las preguntas específicas que aparecen a continuación.

- ☐ 0 = Da un informe de un hecho no-rutinario específico (p. ej., unas vacaciones, una película que ha visto alguna vez, un viaje de compras) que no es parte de una preocupación o de un marcado interés y que pareciera ser real. Da un informe razonable sin necesitar preguntas específicas para ayudarlo, pero puede llegar a necesitar una pregunta general para ayudarlo a comenzar.
- 1 = Da un informe razonable de un hecho rutinario (p. ej., jugar a su juego preferido o la rutina cuando regresa a casa después de la escuela o el trabajo) que no es parte de una preocupación o de un marcado interés y pareciera ser real, sin preguntas específicas que lo guíen. Puede necesitar una pregunta para comenzar. Se incluyen aquí las respuestas a la «tarea de demostración».
- 2 = Da información acerca de un hecho rutinario o no rutinario, pero depende de las preguntas específicas del examinador para poder continuar; O únicamente describe una situación que no pareciera poder ser real.
- 3 = Respuestas inconsistentes o insuficientes, inclusive a las preguntas específicas.

8. Conversación

La atención de este ítem está centrada en el uso de palabras y frases con «ida y vuelta» en una conversación social. En este ítem realice la valoración de acuerdo al nivel de lenguaje expresivo del individuo. Codifique la evidencia (o carencia de) reciprocidad no verbal en «cantidad de comunicación social recíproca» en la sección B de este protocolo.

- ☐ 0 = La conversación fluye, construyéndose sobre el diálogo del examinador. Esta codificación requiere que gran parte del habla del individuo brinde tanto una respuesta al habla del examinador como algo de conversación (no necesariamente una pregunta) que se construya sobre lo que se acaba de decir y que permita una respuesta por parte del examinador (esto es, por lo menos secuencias de cuatro elementos: el examinador abre la conversación, el individuo comenta, el examinador responde, el individuo responde a la respuesta del examinador).
- 1 = Parte del habla del participante incluye algo de elaboración espontánea de sus propias respuestas a beneficio del examinador; O da pautas y entradas al examinador para que pueda seguir la conversación, pero o la cantidad de habla es menor a la esperada para el nivel de lenguaje expresivo del individuo o está limitada en cuanto a flexibilidad.
- 2 = Poca conversación recíproca sostenida por el niño; puede seguir su propio tren de pensamiento más que participar en un intercambio; puede hacer algún ofrecimiento espontáneo de información o realizar comentarios pero con escaso sentido de la reciprocidad.
- 3 = Poca habla comunicativa espontánea (aunque pueda haber mucha habla ecológica o no comunicativa). Asigne este código a aquellos individuos que emiten algunas respuestas limitadas, pero muy escasas.

**9. Gestos descriptivos, convencionales, instrumentales o informativos**

En este ítem la atención está puesta en el uso de gestos descriptivos para representar un objeto o hecho. El uso de gestos convencionales (p. ej., aplaudir para «bien hecho»), informativos o instrumentales (p. ej., señalar, rogar, levantar hombros, menear o sacudir la cabeza) recibe una puntuación parcial. Cuando codifique este ítem incluya los comportamientos que ocurran durante «la tarea de demostración» y durante toda la sesión. No obstante, el énfasis está puesto en cómo el niño utiliza gestos antes de que se le pida o insinue.

☐

0 = Uso espontáneo de varios gestos descriptivos. Los gestos pueden ser típicos o idiosincrásicos, pero deben ser comunicativos. Puede usar además gestos convencionales o instrumentales.

1 = Algún uso espontáneo de gestos descriptivos, pero exagerado o limitado en el rango o variedad de contextos O uso frecuente de gestos convencionales o instrumentales, pero no descriptivos.

2 = Algún uso espontáneo de gestos informativos, convencionales o instrumentales, pero no descriptivos.

3 = Poco o ningún uso de gestos convencionales, instrumentales, informativos o descriptivos.

8 = N.a. (p. ej., limitado por alguna discapacidad física).

B. Interacción social recíproca

Codifique en comparación con su nivel de edad mental no verbal.

1. Contacto visual inusual

La codificación de este ítem requiere que se distinga entre la mirada apropiada que es clara, flexible, modulada socialmente y que se utiliza para una variedad de propósitos, y la que está limitada por ser poco flexible, inapropiada o descontextualizada. Si el individuo es tímido al comienzo pero su mirada cambia marcadamente y consistentemente a medida que se va sintiendo más cómodo, no tenga en cuenta para la codificación las primeras impresiones acerca de su contacto visual. Sin embargo, si el contacto visual no mejora, la codificación se debe basar en lo observado, a pesar de que el individuo parezca «tímido».

☐

0 = Mirada apropiada, con cambios sutiles entremezclados con otro tipo de comunicación.

2 = Establece un contacto visual pobremente modulado socialmente para iniciar, terminar o regular una interacción social.

2. Expresiones faciales dirigidas a otros

Esta codificación debe indicar si las expresiones faciales del individuo están dirigidas a otra persona con la intención de comunicar emociones. Las expresiones faciales que se dirigen a objetos o que no están dirigidas a nada en particular no se codifican aquí. Codifique las expresiones faciales apropiadas si ocurren, aunque haya también expresiones extrañas.

☐

0 = Dirige una variedad de expresiones faciales apropiadas al examinador o a otra persona con la intención de comunicar emociones.

1 = Dirige algunas expresiones faciales al examinador o a otra persona (p. ej., dirige únicamente expresiones que indiquen emociones extremas a los demás u ocasionalmente dirige una variedad más amplia de expresiones). Se le puede asignar este código a un individuo que tenga una variedad limitada de expresiones o que tenga expresiones faciales levemente inusuales, pero que dirige la mayoría de sus expresiones a otra persona.

2 = Rara vez o nunca dirige expresiones faciales apropiadas a otros.



3. Producción de lenguaje y comunicación no-verbal vinculada

El propósito de este ítem es codificar el grado en que, cuando el participante vocaliza, esta vocalización va acompañada de cambios sutiles en la mirada, las expresiones faciales y los gestos. Este ítem se debe codificar de acuerdo a las vocalizaciones producidas, independientemente de la frecuencia con que hayan ocurrido. Base la codificación en aquellas ocasiones más representativas y no simplemente en las mejores. A la hora de realizar la codificación, incluya aquellas vocalizaciones empleadas para iniciar o mantener la interacción o para responder al examinador. Por defecto se deberá asignar un código de «8» (no codificable) si uno o más de los siguientes ítems recibieron un código de «2»: «Contacto visual inusual», «expresiones faciales dirigidas a otros» o «gestos descriptivos, convencionales, instrumentales o informativos».

- ☐ 0 = La vocalización en general se acompaña de cambios sutiles y socialmente adecuados en los gestos, las miradas y las expresiones faciales.
- 1 = La vocalización se acompaña de una variedad o frecuencia de gestos, miradas y expresiones faciales anormal, limitada o inferior a la usual; O usa casi exclusivamente una sola modalidad (p. ej., uso frecuente de la mirada, pero pocos gestos o expresiones faciales).
- 2 = Escasa o nula comunicación no-verbal en conjunción con las vocalizaciones.
- 7 = Cierta evitación de la mirada, en particular al comienzo de la entrevista, quizás debido a timidez, pero muestra cierta modulación y coordinación del lenguaje y las conductas no verbales.
- 8 = N.a.; no hubo vocalizaciones; O el empleo de gestos, expresiones faciales o miradas socialmente dirigidas fue mínimo o nulo. Este código debería ser asignado de forma automática si la ausencia de conjunción entre la vocalización y la comunicación no verbal se debiera a una limitada frecuencia de contacto visual, expresiones faciales o gestos.

4. Placer compartido durante la interacción

Codifique la respuesta social del participante ante cualquiera de las actividades o la conversación. Esta codificación no debe utilizarse para indicar el estado emocional general del individuo durante la entrevista. Tenga en cuenta que es esperable que los niños más mayores y los adolescentes manifiesten su disfrute de una manera más sutil que como lo haría un niño más pequeño. La codificación se refiere a la habilidad del individuo para indicar placer o goce al examinador en la interacción, no simplemente para interactuar.

- ☐ 0 = Muestra claros y apropiados signos de disfrute durante un intercambio interactivo o conversacional en más de una actividad o tema de conversación.
- 1 = Expresa algo de goce apropiado en las acciones del examinador; O muestra claros signos de placer durante una sola interacción.
- 2 = Expresa escaso o nulo placer en la interacción con el examinador. Puede expresar placer en sus propias actividades o en partes de la conversación, pero no en los comportamientos del examinador o en su interacción con él.
- 8 = No se puede valorar este ítem ya sea porque la interacción existente ha sido escasa o nula o por otras razones.

5. Empatía/comentarios sobre las emociones de otros

La atención de este ítem está puesta en lo que el participante comunica sobre su comprensión y empatía de las emociones y sentimientos de otros, ya sean personas reales o aquellas que aparecen en los relatos u otras tareas. En la valoración de este ítem se ha de excluir el «placer compartido durante la interacción» que ya ha sido codificado previamente.

- ☐ 0 = Transmite que claramente comprende y comparte la emoción de otros en variadas y diferentes emociones.
- 1 = Transmite que en cierto grado comprende y comparte la emoción de otros en más de una emoción; O transmite que claramente comprende y comparte 1 emoción experimentada por otro individuo.
- 2 = Transmite que en cierto grado comprende o comparte al menos una experiencia emocional de otro individuo.
- 3 = Escasa o nula manifestación de que comprende o comparte estados emocionales.



Interacción social recíproca (continuación)

6. Insight

Este ítem codifica la capacidad del participante para dar ejemplos espontáneos de comprensión de la naturaleza de las relaciones sociales. Éstos pueden referirse a relaciones estables, como las que ocurren en la amistad o el matrimonio, o a situaciones interactivas, como la relación con otros alumnos en la escuela, que pueden ser tratadas o bien en la conversación o como respuesta a las preguntas socioemocionales. Se valoran dos aspectos separados de las relaciones: (a) la naturaleza de relaciones específicas (p. ej., qué es la amistad) y (b) el rol del participante en estas relaciones.

- ☐ 0 = Muestra varios ejemplos de comprensión de la naturaleza de relaciones sociales típicas, incluyendo la comprensión de su propio rol en, al menos, una de ellas.
- ☐ 1 = Muestra ejemplos de comprensión de varias relaciones sociales típicas, pero no de su propio rol dentro de ellas; O muestra comprensión de sólo una relación y de su rol en ella.
- ☐ 2 = Muestra cierta comprensión de una sola relación social, pero no necesariamente de su rol en esa relación.
- ☐ 3 = Muestra una comprensión escasa o nula de las relaciones sociales típicas, con o sin conocimiento de su rol en ellas.

7. Calidad de los acercamientos sociales

Ésta es una codificación que resume la *cualidad* de los intentos por parte del participante de iniciar una interacción social con el examinador, no la frecuencia con que ocurren. Se debe prestar mayor atención a la forma en que se dan los acercamientos y si son apropiados al contexto social. Asigne el código de acuerdo a la mayoría de los acercamientos al examinador y no simplemente de acuerdo a los mejores. El comportamiento con los padres/cuidadores no se codifica aquí.

- ☐ 0 = Uso efectivo de formas verbales y no-verbales para hacer claros acercamientos sociales hacia el examinador. Los acercamientos deben ser apropiados al contexto inmediato.
- ☐ 1 = Calidad levemente inusual de algunos acercamientos sociales. Pueden restringirse a demandas personales o estar relacionados con intereses propios del individuo, pero con alguna intención de incluir al examinador en ese interés.
- ☐ 2 = Acercamientos inapropiados; muchos acercamientos carecen de integración en el contexto; O carecen de cualidad social. Aquí se incluye el hecho de que el individuo plantee preocupaciones pero con escasa intención de implicar al examinador en ellas.
- ☐ 3 = Insignificante cantidad de acercamientos sociales de cualquier tipo.

8. Calidad de la respuesta social

Ésta es una codificación que resume las respuestas sociales del individuo a lo largo de la sesión.

- ☐ 0 = Gama de respuestas apropiadas que varían de acuerdo a las situaciones y presiones sociales inmediatas.
- ☐ 1 = Muestra respuesta a la mayoría de las situaciones sociales, pero algo limitada, rara socialmente, inapropiada, inconsistente o consistentemente negativa.
- ☐ 2 = Respuestas raras o estereotipadas o respuestas con poca variación o inapropiadas al contexto.
- ☐ 3 = Mínima o inexistente respuesta a los intentos por parte del examinador de involucrar al individuo.

9. Cantidad de comunicación social recíproca

Este ítem se centra en la frecuencia con que ocurren los intercambios recíprocos a lo largo de la sesión usando cualquier forma de comunicación. La *frecuencia* se define tanto por el número absoluto de ocurrencias como por la distribución a través de una variedad de contextos. Este ítem es una codificación de resumen que describe aspectos del comportamiento no-verbal y verbal/vocal que no necesariamente deben estar integrados pero que sí deben terminar en un intercambio recíproco.

- ☐ 0 = Hace un amplio uso de comportamientos verbales o no-verbales para obtener intercambio social (esto es, charlar o hacer comentarios o tener comportamientos que parecen tener una intención de reciprocidad).
- ☐ 1 = Muestra algo de comunicación social recíproca (como en «0»), pero reducida en frecuencia o cantidad o en número de contextos en los que se dan dichos comportamientos (independientemente de la cantidad de charla no-social).
- ☐ 2 = La mayor parte de la comunicación está relacionada o con un objeto (para pedir algo); O en respuesta a una pregunta; O es ecológica; O tiene que ver con ciertas preocupaciones; hay poca «ida y vuelta» o charla social.
- ☐ 3 = Escasa o nula comunicación social recíproca.

**10. Cualidad general del «rapport»**

Ésta es una codificación que resume el juicio general del examinador acerca del «rapport» establecido con el individuo durante la sesión. A la hora de asignar el código a este ítem, el examinador deberá tener en cuenta, en particular, hasta que punto tuvo que modificar su propio comportamiento para mantener la interacción.

☐

0 = Interacción cómoda con el examinador, apropiada al contexto.

1 = Interacción cómoda por momentos, pero no sostenida (p. ej., a veces se percibe como rara o artificial o el comportamiento del individuo parece mecánico o ligeramente inapropiado).

2 = Interacción unilateral o inusual convirtiéndose en una entrevista que es levemente incómoda de forma consistente o una entrevista que hubiera sido difícil si el examinador no hubiera estado constantemente re-estructurando la situación, más allá de lo previsto por las actividades estándar del ADOS.

3 = El individuo muestra poca consideración por el examinador; O la entrevista resulta considerablemente incómoda durante una parte importante del tiempo.



C. Imaginación

Codifique este ítem en comparación con el nivel de lenguaje expresivo.

1. Imaginación y creatividad

A este ítem se le debe asignar un código que refleje el grado en que el individuo exhibe varias formas de creatividad o inventiva durante la sesión de evaluación, ya sea con objetos o mediante descripciones verbales.

- ☐ 0 = Variedad de actividades o comentarios en la conversación que fueron creativos, originales y espontáneos.
- ☐ 1 = Algunas acciones imaginadas (juegos de imaginación) o creativas, pero limitadas en su variedad o en que ocurren solo en respuesta a una situación estructurada (p. ej., a «inventarse una historia»).
- ☐ 2 = Escasas acciones imaginadas (juegos de imaginación) o creativas; O solo presenta acciones que son de cualidad repetitiva; O son de cualidad estereotipada.
- ☐ 3 = No hay acciones creativas o inventivas (ni siquiera repetitivas o estereotipadas).

D. Comportamientos estereotipados e intereses restringidos

Codifique el comportamiento en relación a lo esperado a su edad cronológica.

1. Interés sensorial inusual en los materiales de juego o las personas

Codifique en este ítem el interés o la respuesta inusual a aspectos sensoriales de los juguetes o el ambiente. Si el individuo tiene una preocupación que se basa en un interés sensorial, se puede codificar aquí como un (1) Interés sensorial inusual. Por ejemplo, si muestra interés por los radiadores o las tuberías o las cañerías, esto se codifica en «excesivo interés o referencias a temas u objetos inusuales o altamente específicos o comportamientos repetitivos» que se encuentra más adelante en este protocolo. Si está interesado en los radiadores porque le gusta mirarlos de reojo e inclinando la cabeza, balanceándose de lado a lado, y agitando sus manos, esto se deberá codificar en «manierismos de manos y dedos y otros manierismos complejos», pero también puede codificarse aquí con un código de «1» por el componente sensorial que implica. Si al individuo le gusta mirar de reojo a los radiadores, las esquinas de la habitación, las puertas de los armarios y las láminas o rejillas de las persianas, pero no se preocupa demasiado por ninguno de éstos en particular y no se mueve de una manera peculiar, se le debe asignar un código de «2» en este ítem por intereses sensoriales inusuales y un código de «0» en «manierismos de manos y dedos y otros manierismos complejos». No codifique aquí el tocar el «molde de formas».

- ☐ 0 = No realiza ninguna de las siguientes acciones: olisquear, tocar repetidamente, palpar texturas, lamer o morder, meterse algo en la boca, mostrar interés por repetir ciertos sonidos ni examinar visualmente algo de manera prolongada o inusual.
- ☐ 1 = Intereses sensoriales inusuales ocasionales; O intereses no tan claros como lo que se especifica para una codificación de «2».
- ☐ 2 = Claro interés por elementos no funcionales de los materiales de juego; O examinación sensorial de sí mismo o de otros.

Especifique:

2. Manierismos de manos y dedos y otros manierismos complejos

Codifique aquí los movimientos inusuales o repetitivos o posturas raras de las manos y dedos, de los brazos o de todo el cuerpo. Aplaudir repetidamente puede codificarse aquí. No incluye el balanceo de cuerpo si únicamente tiene lugar con el torso. Tampoco se codifican aquí tamborilear con los dedos, morderse las uñas, jugar enredándose el pelo o chuparse el pulgar. El individuo no tiene que estar mirando el movimiento de sus manos o dedos para que se codifique aquí.

- ☐ 0 = Ninguno.
- ☐ 1 = Manierismos de manos o dedos o manierismos complejos breves u ocasionales; O manierismos que no son tan claros como se especifica en el código de «2».
- ☐ 2 = Hay evidentes movimientos, sacudidas o retorcimientos de dedos o manos; U otros manierismos o estereotipias.

Especifique:



3. Conductas autolesivas

Codifique cualquier tipo de comportamiento que implique un acto de agresión hacia sí mismo, incluso aunque no sea claramente dañino.

- ☐ 0 = No intenta autolesionarse.
- ☐ 1 = Rara vez se autolesiona o no es claro (p. ej., por lo menos una vez se muerde la mano o el brazo cuando está molesto, se tira del pelo, se abofetea su propia cara o se golpea cabeza).
- ☐ 2 = Autolesión claramente presente (p. ej., más de una vez se golpea la cabeza, se abofetea su propia cara, se tira del pelo o se muerde).

4. Excesivo interés o referencias a temas u objetos inusuales o altamente específicos o comportamientos repetitivos

Debido a que los intereses circunscriptos, las preocupaciones o los comportamientos inusuales muchas veces no se pueden juzgar adecuadamente durante una breve observación, este ítem se centra en cualquier referencia que (a) aparezca con una frecuencia inesperadamente elevada, (b) se refiera a un tema inusual o extraño o al uso de un objeto de una manera altamente específica al participante y (c) no esté bien integrada en la conversación. Temas adecuados a la edad o nivel de desarrollo no se deben codificar aquí (p. ej., un niño de 8 años que hable reiteradas veces de sus vacaciones recientes en términos generales no se codificaría aquí, pero si el mismo niño hablara repetidamente de alojarse en la habitación número 465, entonces se podría pensar en codificarlo aquí). Esta codificación se centra en el *tema* al que hace referencia o con el que se relacionan las formas inusuales de comportamiento. El uso de términos inusuales (p. ej., frases estereotipadas) o la falta de flexibilidad en la conversación se codifican en otra parte. Los comportamientos se pueden codificar de dos maneras si es que representan instancias separadas de cada dominio. Por ejemplo, si el individuo dice reiteradas veces «¿necesitan servicio de habitaciones inmediatamente, ahora, en este momento, en este mismo instante en la habitación 465?», usa la misma frase en varios contextos diferentes y hace otros comentarios sobre números de habitaciones de hotel, entonces esto sería codificado tanto en este ítem como en el ítem de «uso estereotipado o idiosincrásico de palabras o frases», que aparece anteriormente en este protocolo. Comportamientos repetitivos que involucren objetos que tienen una secuencia particular (p. ej., alinear cosas) se debieran codificar en el siguiente ítem: «Compulsiones o rituales».

- ☐ 0 = No hubo un excesivo interés o referencias a objetos o temas inusuales o altamente específicos o restringidos.
- ☐ 1 = Referencias ocasionales a temas o patrones de interés inusuales o altamente específicos, que suceden en un grado inusual.
- ☐ 2 = Patrones de intereses estereotipados o inusuales claramente presentes, que pueden o no interferir en la comunicación social.
- ☐ 3 = Preocupación o preocupaciones claramente presentes, hasta el punto que interfieren en la evaluación.

5. Compulsiones o rituales

En este contexto, el énfasis está puesto en la determinación por parte del individuo de llevar a cabo una actividad que implica una secuencia, un punto de finalización o una forma que resultan predecibles y que no se requieren como parte de la tarea del ADOS (p. ej., verificar si una cartera está en un bolso; la insistencia por completar el libro usado para la tarea de relato del cuento; la colocación cuidadosa de los materiales tal cual se presentaron inicialmente; recitar una lista de compañeros de clase como amigos). El recitado de listas se debe codificar aquí.

- ☐ 0 = No hubo actividades o rutinas verbales claras que se debieran llevar a cabo por completo o de acuerdo a una secuencia que no fuera parte de la tarea.
- ☐ 1 = Actividades o lenguaje inusualmente fijado a una rutina (se incluye la insistencia por terminar el libro o por recitar una lista que no es relevante a la conversación), pero no hay comportamientos que sean de cualidad claramente compulsiva.
- ☐ 2 = Una o más actividades o rutinas verbales que el individuo tiene que completar o decir de una manera específica. El individuo parece estar bajo cierta presión o se pone ansioso si una actividad se interrumpe (esto es, está presente la cualidad compulsiva). Se incluye el recitado de listas que se deben completar o que se le pide al examinador que registre (p. ej., amigos, comidas favoritas) o la insistencia en que el examinador responda verbalmente de una manera altamente específica.

Especifique:

**E. Otros comportamientos anormales**

A no ser que se indique lo contrario, codifique todos los ítems que aparecen a continuación sin tener como referencia el nivel de desarrollo ni las destrezas de lenguaje estimadas del evaluado.

1. ▶ Elevado nivel de actividad o agitación

Este ítem describe movimientos excesivos o agitación física. Codifique este ítem en relación a la edad mental no-verbal del individuo.

☐

0 = Se sienta quieto de manera apropiada durante la evaluación.

1 = Se sienta pero está inquieto o se mueve constantemente en la silla. Las dificultades en la evaluación no se deben principalmente a su nivel de actividad o a un estado de agitación.

2 = Dificultades para quedarse sentado; se levanta del asiento o manipula los objetos de una manera que resulta difícil interrumpirlo. El elevado nivel de actividad interfiere con la evaluación.

7 = Muy quieto, poca actividad.

2. ▶ Berrinches, agresiones, comportamientos negativos o disruptivos

Este ítem incluye cualquier forma de enfado (molestia o enojo) o disrupción que va más allá de comunicar una leve frustración o queja.

☐

0 = No se muestra enfadado (molesto, enojado), negativo, destructivo o agresivo ni presenta un comportamiento disruptivo durante la evaluación con el ADOS.

1 = Ocasionalmente se muestra enfadado (molesto, enojado), agresivo, negativo o presenta un comportamiento disruptivo hacia el examinador pero de forma leve (incluye amenazas verbales o un tono de voz deliberadamente alto).

2 = Muestra negativismo marcado o repetitivo o agresiones importantes (p. ej., lanzar cosas, pegar o morder a otros). Aquí se incluyen también los gritos, alaridos o chillidos.

3. ▶ Ansiedad

Ansiedad incluye una cautela inicial, así como también signos más obvios de preocupación.

☐

0 = No hay signos obvios de ansiedad (p. ej., temblor o estar hipervigilante).


1 = Signos leves de ansiedad, especialmente al principio de la entrevista o en respuesta a ítems específicos.

2 = Ansiedad marcada durante la evaluación (puede ser intermitente o continua).

Algoritmo diagnóstico

ADOS

Módulo 3



Nombre y apellidos del evaluado: _____

Fecha de evaluación: Año Mes Día

Sexo: ☐ Varón ☐ Mujer

Fecha de nacimiento:

Examinador: _____

Edad cronológica:

Algoritmo del ADOS para el diagnóstico del autismo de acuerdo con los criterios del DSM-IV y la CIE-10

Para el uso del algoritmo, los códigos de protocolo iguales a 3 deberán considerarse como 2 y aquellos que estén fuera del rango de 0 a 3 deberán transformarse en 0. Obsérvese el cuadro de conversión que aparece a continuación.

CONVERSIÓN DE LOS CÓDIGOS DE LOS ELEMENTOS A PUNTUACIONES DE ALGORITMO

Código	Puntuación del algoritmo
0	→ 0
1	→ 1
2	→ 2
3	→ 2
7	→ 0
8	→ 0

Comunicación

- Uso estereotipado o idiosincrásico de palabras o frases (A-4)
- Narración de sucesos (A-7)
- Conversación (A-8)
- Gestos descriptivos, convencionales, instrumentales o informativos (A-9)
- Total de Comunicación
- (Punto de corte para autismo = 3; para espectro autista = 2)

Interacción social recíproca

- Contacto visual inusual (B-1)
- Expresiones faciales dirigidas a otros (B-2)
- «Insight» (B-6)
- Cualidad de los acercamientos sociales (B-7)
- Cualidad de la respuesta social (B-8)
- Cantidad de comunicación social recíproca (B-9)
- Cualidad general del «rapport» (B-10)
- Total de Interacción social recíproca
- (Punto de corte para autismo = 6; para espectro autista = 4)
- Total de Comunicación + Interacción social recíproca
- (Punto de corte para autismo = 10; para espectro autista = 7)

Imaginación y creatividad

- (C-1)

Comportamientos estereotipados e intereses restringidos

- Interés sensorial inusual en los materiales de juego o las personas (D-1)
- Manerismos de manos y dedos y otros manierismos complejos (D-2)
- Excesivo interés en temas u objetos inusuales o altamente específicos (D-4)
- Compulsiones o rituales (D-5)
- Total de Comportamientos estereotipados e intereses restringidos

Diagnóstico

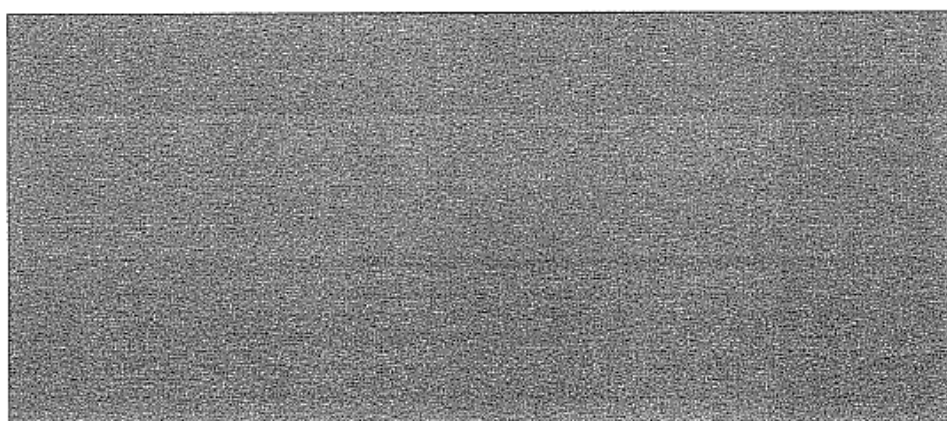
Clasificación del ADOS: _____

Diagnóstico general: _____



Autores: C. Lord, M. Rutter, P. C. DiLavore y S. Risi.
Copyright original © 1999, 2001 by WPS, Western Psychological Services.
Copyright de la edición española © 2008 by TEA Ediciones, S. A. Madrid (España).

15

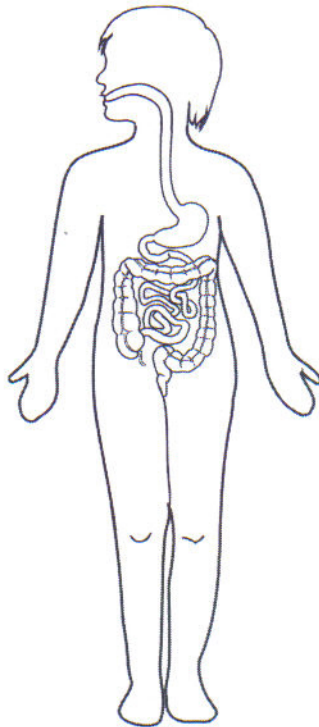


TEA Ediciones
www.teaediciones.com

MADRID • BARCELONA • BILBAO • SEVILLA • ZARAGOZA

**ENCUESTA PARA LOS PADRES
CON NIÑOS DE 4 AÑOS EN
ADELANTE**

**Cuestionario sobre síntomas gastrointestinales
Versión Roma III (QPGS-RIII)**



Instrucciones:

Este cuestionario trata sobre el sistema digestivo de su hijo (esófago, estómago, intestinos y colon) y sobre problemas que pudiera tener con él. Algunos de estos problemas se presentarán en su hijo y otros no.

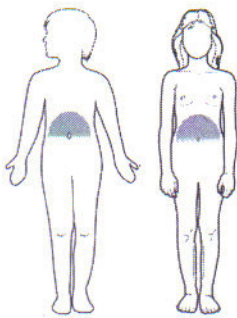
Intente responder al cuestionario lo mejor que pueda, no deje espacios en blanco. Si en alguna pregunta le resulta *imposible* contestar, responda “no lo sé” donde se le indique.

Si tiene alguna duda, un asistente de investigación le ayudará.

ENCUESTA PARA LOS PADRES CON NIÑOS DE 4 AÑOS EN ADELANTE

Sección A. Molestias o dolor en el abdomen superior.

La zona sombreada del dibujo muestra el área POR ENCIMA del ombligo en la cual su hijo puede presentar molestias, dolor o tener una sensación incómoda. Su hijo puede utilizar palabras como “dolor de tripa”, “gases”, “nauseas”, “sentirse lleno” o “no tener hambre”.



Con las preguntas de esta sección queremos saber si su hijo ha sentido molestias, o dolor POR ENCIMA DEL OMBLIGO, en los últimos 2 meses.

Los niños pueden tener molestias en más de una zona abdominal, en otra sección del cuestionario le preguntaremos por la zona inferior, debajo del ombligo.

d. En los últimos 2 meses, ¿con que frecuencia ha sentido su hijo dolor o molestias gástricas por encima del ombligo?

- 0 __ Nunca
- 1 __ Entre 1 y 3 veces al mes
- 2 __ 1 vez a la semana
- 3 __ Varias veces por semana
- 4 __ Todos los días

Si su hijo no ha tenido ninguna molestia gástrica en los últimos 2 meses pase a la sección B.

e. Seleccione cual de las siguientes molestias ha tenido su hijo por encima del ombligo.

Puede marcar más de una.

- | | | |
|--------------------------|---------|---------|
| a. Dolor | 0 __ No | 1 __ Si |
| b. Nauseas | 0 __ No | 1 __ Si |
| c. Gases, hinchazón | 0 __ No | 1 __ Si |
| d. Sensación de plenitud | 0 __ No | 1 __ Si |
| e. Falta de apetito | 0 __ No | 1 __ Si |

<p style="text-align: center;">ENCUESTA PARA LOS PADRES CON NIÑOS DE 4 AÑOS EN ADELANTE</p>
--

f. En los últimos 2 meses, ¿cuánto le molestó o dolió a su hijo el estómago por *encima* del ombligo?

- 1 __ Un poco
- 2 __ Algo (entre un poco y mucho)
- 3 __ Mucho
- 4 __ Muchísimo
- __ No lo sé

g. Cuando a su hijo le duele o se siente incómodo por *encima* del ombligo, ¿Cuánto tiempo le suele durar?

- 1 __ Menos de 1 hora
- 2 __ Entre 1 y 2 horas
- 3 __ Entre 3 y 4 horas
- 4 __ La mayor parte del día
- 5 __ Todo el tiempo

h. ¿Cuánto tiempo lleva su hijo con dolor o molestias gástricas por *encima* del ombligo?

- 1 __ 1 mes o menos
- 2 __ 2 meses
- 3 __ 3 meses
- 4 __ Entre 4 y 11 meses
- 5 __ 1 año o más

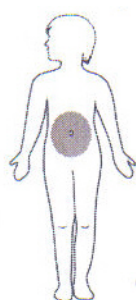
<p style="text-align: center;">ENCUESTA PARA LOS PADRES CON NIÑOS DE 4 AÑOS EN ADELANTE</p>
--

<i>Rodee con un circulo su respuesta</i>	0% de las veces	25% de las veces	50% de las veces	75% de las veces	100% de las veces	No sé
En los últimos 2 meses, cuando su hijo ha tenido dolor o molestias por encima del ombligo, ¿con qué frecuencia...	Nunca	De vez en cuando	A veces	La mayor parte del tiempo	Siempre	(marcar con una cruz)
6. El dolor o molestia mejoró después de que el niño evacuara?	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>
7. Ha tenido su hijo heces pastosas o líquidas?	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>
8. Ha tenido su hijo heces duras o estreñimiento?	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>
9. Ha realizado su hijo mas deposiciones que normalmente?	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>
10. Ha realizado su hijo menos deposiciones que normalmente?	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>
11. Se sintió hinchado?	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>
12. Tuvo su hijo dolor de cabeza?	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>
13. Tuvo problemas para dormir?	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>
14. Tuvo dolor en los brazos, piernas o espalda?	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>
15. Se sintió mareado o débil?	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>
16. Faltó a la escuela o a actividades?	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>

ENCUESTA PARA LOS PADRES CON NIÑOS DE 4 AÑOS EN ADELANTE

Sección B. Molestias o Dolor alrededor o por debajo del ombligo

Las preguntas de esta sección se refieren a las áreas de ALREDEDOR o POR DEBAJO del ombligo de su hijo. Son las zonas sombreadas del dibujo. A veces los niños tienen dolor o molestias en estas áreas. A veces las molestias no son tan fuertes como un dolor. Normalmente los niños se refieren a estas molestias como “dolor de tripa” o “dolor de estómago”.



ALREDEDOR DEL OMBLIGO



POR DEBAJO DEL OMBLIGO

I. En los últimos 2 meses, ¿con qué frecuencia ha tenido su hijo dolor o molestias *alrededor o por debajo* del ombligo?

- 0 __ Nunca
- 1 __ Entre 1 y 3 veces al mes
- 2 __ 1 vez a la semana
- 3 __ Varias veces en semana
- 4 __ Todos los días

Si su hijo no ha tenido NINGUNA molestia o dolor en estas zonas en los últimos 2 meses, pase a la sección C.

II. En los últimos 2 meses, ¿cuanto le molestó o dolió a su hijo *alrededor o por debajo* del ombligo?

- 1 __ Un poco
- 2 __ Algo (entre un poco y mucho)
- 3 __ Mucho
- 4 __ Muchísimo
- __ No lo sé

ENCUESTA PARA LOS PADRES CON NIÑOS DE 4 AÑOS EN ADELANTE

III. Cuando a su hijo le duele o se siente incómodo *alrededor o por debajo* del ombligo, ¿Cuánto tiempo le suele durar?

- 1 __ Menos de 1 hora
 2 __ Entre 1 y 2 horas
 3 __ Entre 3 y 4 horas
 4 __ La mayor parte del día
 5 __ Todo el tiempo

IV. ¿Cuánto tiempo lleva su hijo con dolor o molestias gástricas *alrededor o por debajo* del ombligo?

- 1 __ 1 mes o menos
 2 __ 2 meses
 3 __ 3 meses
 4 __ Entre 4 y 11 meses
 5 __ 1 año o más

<i>Rodee con un círculo su respuesta</i>	0% de las veces	25% de las veces	50% de las veces	75% de las veces	100% de las veces	No sé
En los últimos 2 meses, cuando su hijo ha tenido molestias estomacales, <i>alrededor o por debajo</i> del ombligo, ¿con que frecuencia...	Nunca	De vez en cuando	A veces	La mayor parte del tiempo	Siempre	(marcar con una cruz)
5. El dolor o molestia mejoró después de que el niño evacuara?	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>
6. Ha tenido su hijo heces pastosas o líquidas?	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>
7. Ha tenido su hijo heces duras o estreñimiento?	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>
8. Ha realizado su hijo mas deposiciones que	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>

normalmente?						
9. Ha realizado su hijo menos deposiciones que normalmente?	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>
10. Se sintió hinchado?	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>
11. Tuvo su hijo dolor de cabeza?	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>
12. Tuvo problemas para dormir?	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>
13. Tuvo dolor en los brazos, piernas o espalda?	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>
14. Se sintió mareado o débil?	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>
15. Faltó a la escuela o a actividades?	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>

16. En el último año, ¿cuántas veces ha tenido su hijo un episodio de dolor intenso alrededor del ombligo que haya durado alrededor de 2 horas o más y ha supuesto que su hijo haya tenido que parar lo que estaba haciendo?

0 __ Nunca (*si nunca, pasa a la sección C*)

1 __ 1 vez

2 __ 2 veces

3 __ Entre 3 y 5 veces

4 __ 6 o más veces

16A. Durante el episodio de dolor intenso, ¿tuvo su hijo algún síntoma de los siguientes?

a. Falta de apetito

0 __ No

1 __ Si

b. Sentirse malo del estómago

0 __ No

1 __ Si

c. Vomitar

0 __ No

1 __ Si

d. Piel pálida

0 __ No

1 __ Si

e. Dolor de cabeza

0 __ No

1 __ Si

f. Sensibilidad ocular a la luz

0 __ No

1 __ Si

16B. En el intervalo entre episodios de dolor intenso, ¿vuelve su hijo a su estado de salud normal durante varias semanas o más?

0 __ No

1 __ Si

<p style="text-align: center;">ENCUESTA PARA LOS PADRES CON NIÑOS DE 4 AÑOS EN ADELANTE</p>
--

Sección C. Movimientos intestinales (“caca”, “popó”, “número 2”).

En esta sección le vamos a preguntar sobre los movimientos intestinales de su hijo. Los niños utilizan muchas palabras para referirse a estos movimientos, como “caca”, “popó”, “necesidad de volver a ir al baño”...Quizás en su familia utilice otra palabras.

d. En los últimos 2 meses, ¿con qué frecuencia hizo deposición su hijo?

- 1 ☐ 2 veces a la semana o menos
- 2 ☐ De 3 a 6 veces a la semana
- 3 ☐ 1 vez al día
- 4 ☐ De 2 a 3 veces al día
- 5 ☐ Más de 3 veces al día
- ☐ No lo sé

e. En los últimos 2 meses, ¿cómo han sido las deposiciones de su hijo?

- 1 ☐ Muy duras
- 2 ☐ Duras
- 3 ☐ Ni muy duras ni muy blandas
- 4 ☐ Blandas, pastosas
- 5 ☐ Líquidas
- 6 ☐ Depende, no son siempre iguales
- ☐ No lo sé

2A. Si su hijo ha tenido deposiciones duras, ¿Cuánto tiempo han sido así?

- 0 ☐ Menos de 1 mes
- 1 ☐ 1 mes
- 2 ☐ 2 meses
- 3 ☐ 3 o más meses

f. En los últimos 2 meses, ¿le duele a su hijo cuando hace deposiciones?

- 0 ☐ No
- 1 ☐ Si
- ☐ No lo sé

ENCUESTA PARA LOS PADRES CON NIÑOS DE 4 AÑOS EN ADELANTE

<i>Rodee con un circulo su respuesta</i>	0% de las veces	25% de las veces	50% de las veces	75% de las veces	100% de las veces	No sé
En los 2 últimos meses, ¿con que frecuencia...	Nunca	De vez en cuando	A veces	La mayor parte del tiempo	Siempre	(marcar con una cruz)
4. Ha tenido su hijo que ir corriendo al baño?	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>
5. Tuvo su hijo que hacer esfuerzo para realizar la deposición?	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>
6. Expulsó su hijo moco (blanco, amarillo, fibroso, viscoso) junto con la deposición?	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>
7. Tuvo su hijo la sensación de que no había acabado (que tenía mas deposiciones que no conseguía expulsar)?	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>

d. En los 2 últimos meses, ¿tuvo su hijo alguna deposición tan abundante que atascó el baño?

0 __ No

1 __ Si

d. Algunos niños aguantan el ir al baño incluso cuando hay un servicio disponible. Hacen esto poniéndose tiesos o cruzando las piernas. En los últimos 2 meses, ¿Cuántas veces ha hecho esto su hijo estando en casa?

0 __ Nunca

1 __ De 1 a 3 veces al mes

2 __ Una vez a la semana

3 __ Varias veces a la semana

4 __ Todos los días

<p style="text-align: center;">ENCUESTA PARA LOS PADRES CON NIÑOS DE 4 AÑOS EN ADELANTE</p>
--

10. ¿Alguna vez algún doctor ha diagnosticado que su hijo tenía fecalomas? (heces en el intestino que no es posible expulsar)

- 0 __ No
1 __ Si

11. En los 2 últimos meses, ¿con que frecuencia ha tenido su hijo la ropa interior manchada con restos fecales?

- 0 __ Nunca (si nunca, por favor vaya a la Sección D)
1 __ Menos de 1 vez al mes
2 __ De 1 a 3 veces al mes
3 __ 1 vez a la semana
4 __ Varias veces a la semana
5 __ Todos los días

11A Cuando su hijo ha tenido manchada la ropa interior, ¿cuánto estaba manchada?

- 1 __ Estaba manchada, sucia (sin restos de heces)
2 __ Tenía restos de heces
3 __ Tenía gran cantidad de restos, como una deposición normal

11B ¿Durante cuanto tiempo ha estado manchando su hijo la ropa interior?

- 1 __ 1 mes o menos
2 __ 2 meses
3 __ 3 meses
4 __ De 4 a 11 meses
5 __ 1 año o más

ENCUESTA PARA LOS PADRES CON NIÑOS DE 4 AÑOS EN ADELANTE

Sección D. Otros síntomas

<i>Rodee con un círculo su respuesta</i>	0% de las veces	25% de las veces	50% de las veces	75% de las veces	100% de las veces	No sé
En los 2 últimos meses, ¿Con que frecuencia su hijo..	Nunca	De vez en cuando	A veces	La mayor parte del tiempo	Siempre	(marcar con una cruz)
1. Ha eructado muchas veces sin querer?	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>
2. Ha tenido muchos gases?	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>
3. Se le ha ido hinchando la tripa a lo largo del día? (de modo que usted lo pudiera ver)	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>
4. Ha tragado aire extra? (usted puede escuchar como traga aire)	0	1	2	3	4	<input type="checkbox"/>

e. EN EL ÚLTIMO AÑO, ¿Cuántas veces ha vomitado su hijo varias veces sin poder parar durante 2 horas o más?

0 __ Nunca (*si es nunca, vaya a la sección E*)

1 __ 1 vez

2 __ 2 veces

3 __ 3 veces

4 __ 4 o más veces

5A ¿Cuánto tiempo le han durado a su hijo estos episodios de vómitos repetidos imparables (incoercibles)?

1 __ 1 mes o menos

2 __ 2 meses

3 __ 3 meses

4 __ De 4 a 11 meses

5 __ 1 año o más

<p style="text-align: center;">ENCUESTA PARA LOS PADRES CON NIÑOS DE 4 AÑOS EN ADELANTE</p>
--

5B Cuando su hijo tuvo los episodios de vómitos, ¿sintió náuseas antes?

0 __ No

1 __ Si

5C ¿Ha disfrutado su hijo de buena salud durante algunas semanas o más entre los episodios de vómitos?

0 __ No

1 __ Si

f. En los 2 últimos meses, ¿Cuántas veces ha tenido arcadas o regurgitado la comida su hijo tras comer?

0 __ Nunca (*si nunca, vaya a la sección E*)

1 __ De 1 a 3 veces al mes

2 __ 1 vez a la semana

3 __ Varias veces a la semana

4 __ Todos los días

6A ¿Suele ocurrir esto en la primera hora tras la comida?

0 __ No

1 __ Si

6B Mientras su hijo esta durmiendo, ¿vuelve la comida a su boca?

0 __ No

1 __ Si

6C Cuando la comida le vuelve a la boca, ¿siente náuseas o ganas de vomitar?

0 __ No

1 __ Si

<p style="text-align: center;">ENCUESTA PARA LOS PADRES CON NIÑOS DE 4 AÑOS EN ADELANTE</p>
--

6D ¿Le duele cuando la comida le vuelve a la boca?

0 ☐ No

1 ☐ Si

6E Cuando la comida le vuelve a la boca, ¿Qué suele hacer su hijo?

0 ☐ La traga

1 ☐ La escupe

<p>INSTRUCCIONES PARA LA PUNTUACION DE LA ENCUESTA DE LOS PADRES Y LA ENCUESTA AUTOAPLICADA DE LOS NIÑOS/ADOLESCENTES</p>
--

**Cuestionario sobre síntomas gastrointestinales
Versión Roma III (QPGS-RIII)**

Nota: Los ítems están agrupados por secciones (ej: A1 correspondería al ítem 1 de la Sección A). Para cada trastorno, el paciente debe cumplir los criterios de inclusión. Los puntos de corte sobre la frecuencia de cada síntoma necesaria para cumplir los criterios diagnósticos están basados en recomendaciones del Comité de Niños y Adolescentes Roma III.

12. Dispepsia Funcional

- ☐ (A 1) Dolor o molestia en el abdomen superior “varias veces a la semana” o “más frecuentemente”
- ☐ (A 5) Duración del dolor o molestia de “2 meses” o más
- ☐ (A 6) No se alivia exclusivamente con la deposición. A6 correspondería a “algunas veces” o con menos frecuencia.
- ☐ No está asociado a cambios con la deposición: Indicado para “nunca” o “de vez en cuando”-
- ☐ (A 7) Deposiciones más blandas ☐ (A 8) Deposiciones más duras
- ☐ No está asociado a cambios en la frecuencia intestinal: Indicado para “nunca” o “de vez en cuando”
- ☐ (A 9) Más deposiciones ☐ (A 10) Menos deposiciones

<p align="center">INSTRUCCIONES PARA LA PUNTUACION DE LA ENCUESTA DE LOS PADRES Y LA ENCUESTA AUTOAPLICADA DE LOS NIÑOS/ADOLESCENTES</p>

13. Síndrome del intestino irritable (SII)

Dolor abdominal inferior asociado a síntomas intestinales

- ☐ (B 1) Dolor o molestia abdominal inferior o periumbilical “una vez a la semana” o más a menudo
- ☐ (B 4) Duración de la molestia o dolor abdominal inferior o periumbilical de “2 meses” o más.
- ☐ Al menos 2 de los siguientes “algunas veces” o más a menudo:
- ☐ (B 5) se calma con la deposición
- ☐ Cambios en la forma de las deposiciones: ☐ (B 6) más blanda o ☐ (B 7) más dura
- ☐ Cambios en la frecuencia intestinal: ☐ (B 8) más a menudo o ☐ (B 9) menos

Y/O

Dolor abdominal superior asociado a síntomas intestinales

- ☐ (A 1) Dolor o molestias abdominales superiores “una vez a la semana” o más a menudo.
- ☐ (A 5) Duración de la molestia o dolor abdominal de “2 meses” o más
- ☐ Al menos 2 de los siguientes “algunas veces” o a menudo:
- ☐ (A 6) se calma con la deposición
- ☐ Cambios en la forma de las deposiciones: ☐ (A 7) más blanda o ☐ (A 8) más dura
- ☐ Cambios en la frecuencia intestinal: ☐ (A 9) más a menudo o ☐ (A 10) menos

Nota: síntomas adicionales que sugieren SII pero no son requeridos: C4, C5, C6 y C7.

14. Migraña abdominal

- ☐ (B 16) En el último año, 2 o más episodios de dolor intenso de 1 hora o más de duración provocando restricción de actividades diarias.
- ☐ (B 16a) 2 o más de los siguientes episodios:
- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> a. falta de apetito | <input type="checkbox"/> d. piel pálida |
| <input type="checkbox"/> b. nausea | <input type="checkbox"/> e. dolor de cabeza |
| <input type="checkbox"/> c. vómitos | <input type="checkbox"/> f. sensibilidad ocular a la luz |
- ☐ (B 16b) Periodos sin síntomas entre episodios de dolor (“si”)

**INSTRUCCIONES PARA LA PUNTUACION DE LA
ENCUESTA DE LOS PADRES Y LA ENCUESTA
AUTOAPLICADA DE LOS NIÑOS/ADOLESCENTES**

15. Dolor abdominal funcional

Localizado en el abdomen inferior

- ☐ (B 1) Dolor periumbilical/abdomen inferior “una vez a la semana” o más a menudo
- ☐ (B 4) Duración del dolor abdominal de “2 meses” o más
- ☐ No cumple criterios para otros trastornos gastrointestinales funcionales que presentan dolor abdominal (dispepsia funcional, migraña abdominal, SII, síndrome de dolor abdominal funcional)

Localizado en abdomen superior

- ☐ (A 1) Dolor abdominal superior “una vez a la semana” o mas a menudo
- ☐ (A 5) La duración del dolor abdominal es de “2 meses” o más
- ☐ No cumple criterios para otros trastornos gastrointestinales que presentan dolor abdominal (dispepsia funcional, migraña abdominal, SII, síndrome de dolor abdominal funcional)

16. Síndrome de dolor abdominal funcional

Localizado en abdomen inferior

- ☐ (B 1) Dolor periumbilical/abdominal inferior “varias veces a la semana” o mas a menudo
- ☐ (B 4) La duración del dolor abdominal es de “2 meses” o más
- ☐ **O** ☐ Dos o más síntomas somáticos “una vez a la semana” o más:
- ☐ (B 11) Dolor de cabeza
- ☐ (B 12) Dificultad para dormir
- ☐ (B 13) Dolor en los brazos, piernas o espalda
- ☐ (B 14) Mareo o debilidad
- ☐ **O** ☐ (B 15) Falta a actividades “de vez en cuando” o más a menudo
- ☐ No cumple criterios para otros trastornos gastrointestinales que presentan dolor abdominal (dispepsia funcional, migraña abdominal, SII, síndrome de dolor abdominal funcional)

<p style="text-align: center;">INSTRUCCIONES PARA LA PUNTUACION DE LA ENCUESTA DE LOS PADRES Y LA ENCUESTA AUTOAPLICADA DE LOS NIÑOS/ADOLESCENTES</p>
--

Localizado en abdomen superior

- ☐ (A 1) Dolor abdominal superior “varias veces a la semana” o más a menudo
☐ (A 5) La duración del dolor abdominal es de “2 meses” o más
☐ O ☐ dos o más síntomas somáticos “una vez a la semana” o más a menudo
 ☐ (A 12) Dolor de cabeza
 ☐ (A 13) Dificultad para dormir
 ☐ (A 14) Dolor en los brazos, piernas o espalda
 ☐ (A 15) Mareo o debilidad
☐ O ☐ falta a actividades “de vez en cuando” o más a menudo
☐ No cumple criterios para otros trastornos gastrointestinales que presentan dolor abdominal (dispepsia funcional, migraña abdominal, SII, síndrome de dolor abdominal funcional)

17. Estreñimiento funcional

- ☐ Dos o más de los siguientes:
 ☐ (C 1) Dos o menos deposiciones a la semana
 ☐ O ☐ (C 2) deposiciones duras O ☐ (C 3) dolor al defecar
 ☐ (C 8) Deposición muy abundante
 ☐ (C 9) Aguantarse las ganas de ir al baño “una vez a la semana” o más
 ☐ (C 10) Historial de fecalomas
 ☐ (C 11) Mancha la ropa interior “una vez a la semana” o más a menudo
☐ No cumple criterios para el Síndrome de Intestino Irritable

18. Incontinencia no retentiva

- ☐ El niño tiene 4 años o más
☐ (C 11) Mancha la ropa interior “una vez a la semana” o más a menudo
☐ (C 11a) Pequeña o gran cantidad de restos en la ropa interior (no solo mancha)
☐ (C 11b) Mancha la ropa interior 2 meses o más
☐ No existe evidencia de retención fecal (no cumple criterios de estreñimiento funcional)

19. Aerofagia

- ☐ Dos o más de los siguientes “varias veces a la semana” o “todos los días”
 ☐ O: ☐ (D 1)eructar O ☐ (D 2) flato
 ☐ (D 3) Distensión abdominal
 ☐ (D 4) Tragar aire

<p>INSTRUCCIONES PARA LA PUNTUACION DE LA ENCUESTA DE LOS PADRES Y LA ENCUESTA AUTOAPLICADA DE LOS NIÑOS/ADOLESCENTES</p>
--

20. Síndrome de Vómitos Cíclicos

- ☐ (D 5) Tres o más episodios de vómitos repetidos durante el último año
- ☐ (D 5a) La duración es de 2 meses o más
- ☐ (D 5b) Existe presencia de nausea
- ☐ (D 5c) Existe un intervalo de mejoría entre episodios

21. Síndrome Rumiativo en el Adolescente

- ☐ (D 6) La comida le vuelve a la boca “varias veces a la semana” o “todos los días”
- ☐ (D 6a) Los episodios ocurren nada mas comer (“sí”)
- ☐ (D 6b) Los episodios NO ocurren durante el sueño (“no”)
- ☐ (D 6c) Los episodios NO están acompañados de nausea o vómito (“no”)
- ☐ (D 6d) Los episodios NO son dolorosos (“no”)

En caso de usted sospeche que su hijo parece de algún tipo de intolerancia alimentaria o patología digestiva, que no ha quedado adecuadamente reflejada en el cuestionario anterior, por favor, especifique sus sospechas y en qué las basa:

BIBLIOGRAFÍA

1. Wing L. Asperger's syndrome: a clinical account. *Psychol Med*. 1981 Feb;11(1):115-29. PubMed PMID: 7208735. Epub 1981/02/01. eng.
2. Rutter M. Diagnosis and definition of childhood autism. *J Autism Child Schizophr*. 1978 Jun;8(2):139-61. PubMed PMID: 670129. Epub 1978/06/01. eng.
3. Wing L, Gould J. Severe impairments of social interaction and associated abnormalities in children: epidemiology and classification. *J Autism Dev Disord*. 1979 Mar;9(1):11-29. PubMed PMID: 155684. Epub 1979/03/01. eng.
4. Hendren RL, Bertoglio K, Ashwood P, Sharp F. Mechanistic biomarkers for autism treatment. *Med Hypotheses*. 2009 Dec;73(6):950-4. PubMed PMID: 19619951. Epub 2009/07/22. eng.
5. Boyle CA, Boulet S, Schieve LA, Cohen RA, Blumberg SJ, Yeargin-Allsopp M, et al. Trends in the Prevalence of Developmental Disabilities in US Children, 1997-2008. *Pediatrics*. 2011 Jun;127(6):1034-42. PubMed PMID: 21606152. Epub 2011/05/25. eng.
6. Liu KY, King M, Bearman PS. Social influence and the autism epidemic. *AJS*. 2010 Mar;115(5):1387-434. PubMed PMID: 20503647. Pubmed Central PMCID: 2927813. Epub 2010/05/28. eng.
7. Baird G, Simonoff E, Pickles A, Chandler S, Loucas T, Meldrum D, et al. Prevalence of disorders of the autism spectrum in a population cohort of

children in South Thames: the Special Needs and Autism Project (SNAP). Lancet. 2006 Jul 15;368(9531):210-5. PubMed PMID: 16844490. Epub 2006/07/18. eng.

8. Fombonne E. Epidemiology of pervasive developmental disorders. Pediatr Res. 2009 Jun;65(6):591-8. PubMed PMID: 19218885. Epub 2009/02/17. eng.

9. Williams JG, Higgins JP, Brayne CE. Systematic review of prevalence studies of autism spectrum disorders. Arch Dis Child. 2006 Jan;91(1):8-15. PubMed PMID: 15863467. Pubmed Central PMCID: 2083083. Epub 2005/05/03. eng.

10. Weintraub K. The prevalence puzzle: Autism counts. Nature. 2011 Nov 3;479(7371):22-4. PubMed PMID: 22051656. Epub 2011/11/05. eng.

11. Kidd PM. Autism, an extreme challenge to integrative medicine. Part: 1: The knowledge base. Altern Med Rev. 2002 Aug;7(4):292-316. PubMed PMID: 12197782. Epub 2002/08/29. eng.

12. Persico AM, Bourgeron T. Searching for ways out of the autism maze: genetic, epigenetic and environmental clues. Trends Neurosci. 2006 Jul;29(7):349-58. PubMed PMID: 16808981. Epub 2006/07/01. eng.

13. Betancur C. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. Brain Res. 2011 Mar

22;1380:42-77. PubMed PMID: 21129364. Epub 2010/12/07. eng.

14. Parellada M, Boada L, Moreno C, Llorente C, Romo J, Muela C, et al. Specialty Care Programme for autism spectrum disorders in an urban population: A case-management model for health care delivery in an ASD population. *European psychiatry : the journal of the Association of European Psychiatrists*. 2013 Feb;28(2):102-9. PubMed PMID: 21907549.

15. Gupta AR, State MW. Recent advances in the genetics of autism. *Biol Psychiatry*. 2007 Feb 15;61(4):429-37. PubMed PMID: 16996486. Epub 2006/09/26. eng.

16. Strauss KA, Puffenberger EG, Huentelman MJ, Gottlieb S, Dobrin SE, Parod JM, et al. Recessive symptomatic focal epilepsy and mutant contactin-associated protein-like 2. *N Engl J Med*. 2006 Mar 30;354(13):1370-7. PubMed PMID: 16571880. Epub 2006/03/31. eng.

17. Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, et al. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet*. 2007 Jan;39(1):25-7. PubMed PMID: 17173049. Pubmed Central PMCID: 2082049. Epub 2006/12/19. eng.

18. Morrow EM, Yoo SY, Flavell SW, Kim TK, Lin Y, Hill RS, et al. Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry. *Science*. 2008 Jul 11;321(5886):218-23. PubMed PMID: 18621663. Pubmed Central PMCID:

2586171. Epub 2008/07/16. eng.

19. El-Fishawy P, State MW. The genetics of autism: key issues, recent findings, and clinical implications. *Psychiatr Clin North Am*. 2010 Mar;33(1):83-105. PubMed PMID: 20159341. Pubmed Central PMCID: 2841771. Epub 2010/02/18. eng.

20. Kumar RA, KaraMohamed S, Sudi J, Conrad DF, Brune C, Badner JA, et al. Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism. *Hum Mol Genet*. 2008 Feb 15;17(4):628-38. PubMed PMID: 18156158. Epub 2007/12/25. eng.

21. Weiss LA, Shen Y, Korn JM, Arking DE, Miller DT, Fossdal R, et al. Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N Engl J Med*. 2008 Feb 14;358(7):667-75. PubMed PMID: 18184952. Epub 2008/01/11. eng.

22. Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, Anney R, Merico D, Regan R, et al. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*. 2010 Jul 15;466(7304):368-72. PubMed PMID: 20531469. Pubmed Central PMCID: 3021798. Epub 2010/06/10. eng.

23. Schaaf CP, Zoghbi HY. Solving the autism puzzle a few pieces at a time. *Neuron*. 2011 Jun 9;70(5):806-8. PubMed PMID: 21658575. Epub 2011/06/11. eng.

24. Shen Y, Dies KA, Holm IA, Bridgemohan C, Sobeih MM, Caronna EB, et

al. Clinical genetic testing for patients with autism spectrum disorders. *Pediatrics*. 2010 Apr;125(4):e727-35. PubMed PMID: 20231187.

25. Liu J, Nyholt DR, Magnussen P, Parano E, Pavone P, Geschwind D, et al. A genomewide screen for autism susceptibility loci. *Am J Hum Genet*. 2001 Aug;69(2):327-40. PubMed PMID: 11452361. Pubmed Central PMCID: 1235325. Epub 2001/07/14. eng.

26. Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, Bolton P, Simonoff E, Yuzda E, et al. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol Med*. 1995 Jan;25(1):63-77. PubMed PMID: 7792363. Epub 1995/01/01. eng.

27. Muhle R, Trentacoste SV, Rapin I. The genetics of autism. *Pediatrics*. 2004 May;113(5):e472-86. PubMed PMID: 15121991. Epub 2004/05/04. eng.

28. Newschaffer CJ, Fallin D, Lee NL. Heritable and nonheritable risk factors for autism spectrum disorders. *Epidemiol Rev*. 2002;24(2):137-53. PubMed PMID: 12762089. Epub 2003/05/24. eng.

29. Croen LA, Grether JK, Selvin S. Descriptive epidemiology of autism in a California population: who is at risk? *J Autism Dev Disord*. 2002 Jun;32(3):217-24. PubMed PMID: 12108623. Epub 2002/07/11. eng.

30. Croen LA, Najjar DV, Fireman B, Grether JK. Maternal and paternal age and risk of autism spectrum disorders. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2007

Apr;161(4):334-40. PubMed PMID: 17404129. Epub 2007/04/04. eng.

31. Durkin MS, Maenner MJ, Newschaffer CJ, Lee LC, Cunniff CM, Daniels JL, et al. Advanced parental age and the risk of autism spectrum disorder. *Am J Epidemiol.* 2008 Dec 1;168(11):1268-76. PubMed PMID: 18945690. Pubmed Central PMCID: 2638544. Epub 2008/10/24. eng.

32. Armengol L, Rabionet R, Estivill X. The emerging role of structural variations in common disorders: initial findings and discovery challenges. *Cytogenet Genome Res.* 2008;123(1-4):108-17. PubMed PMID: 19287145. Epub 2008/01/01. eng.

33. Herbert MR. Contributions of the environment and environmentally vulnerable physiology to autism spectrum disorders. *Curr Opin Neurol.* 2010 Apr;23(2):103-10. PubMed PMID: 20087183. Epub 2010/01/21. eng.

34. Landrigan PJ. What causes autism? Exploring the environmental contribution. *Curr Opin Pediatr.* 2010 Apr;22(2):219-25. PubMed PMID: 20087185. Epub 2010/01/21. eng.

35. Ming X, Brimacombe M, Malek JH, Jani N, Wagner GC. Autism spectrum disorders and identified toxic land fills: co-occurrence across States. *Environ Health Insights.* 2008;2:55-9. PubMed PMID: 21572830. Pubmed Central PMCID: 3091342. Epub 2008/01/01. eng.

36. Hertz-Picciotto I, Croen LA, Hansen R, Jones CR, van de Water J,

Pessah IN. The CHARGE study: an epidemiologic investigation of genetic and environmental factors contributing to autism. *Environ Health Perspect.* 2006 Jul;114(7):1119-25. PubMed PMID: 16835068. Pubmed Central PMCID: 1513329. Epub 2006/07/13. eng.

37. Volk HE, Hertz-Picciotto I, Delwiche L, Lurmann F, McConnell R. Residential proximity to freeways and autism in the CHARGE study. *Environ Health Perspect.* 2011 Jun;119(6):873-7. PubMed PMID: 21156395. Pubmed Central PMCID: 3114825. Epub 2010/12/16. eng.

38. Hertz-Picciotto I, Bergman A, Fangstrom B, Rose M, Krakowiak P, Pessah I, et al. Polybrominated diphenyl ethers in relation to autism and developmental delay: a case-control study. *Environ Health.* 2011;10(1):1. PubMed PMID: 21205326. Pubmed Central PMCID: 3029221. Epub 2011/01/06. eng.

39. Hertz-Picciotto I, Green PG, Delwiche L, Hansen R, Walker C, Pessah IN. Blood mercury concentrations in CHARGE Study children with and without autism. *Environ Health Perspect.* 2010 Jan;118(1):161-6. PubMed PMID: 20056569. Pubmed Central PMCID: 2831962. Epub 2010/01/09. eng.

40. Wright B, Pearce H, Allgar V, Miles J, Whitton C, Leon I, et al. A Comparison of Urinary Mercury between Children with Autism Spectrum Disorders and Control Children. *PLoS One.* 2012;7(2):e29547. PubMed PMID: 22355303. Pubmed Central PMCID: 3280241. Epub 2012/02/23. eng.

41. Mackert JR, Jr. Randomized controlled trial demonstrates that exposure to mercury from dental amalgam does not adversely affect neurological development in children. *J Evid Based Dent Pract*. 2010 Mar;10(1):25-9. PubMed PMID: 20230961. Epub 2010/03/17. eng.
42. Price CS, Thompson WW, Goodson B, Weintraub ES, Croen LA, Hinrichsen VL, et al. Prenatal and Infant Exposure to Thimerosal From Vaccines and Immunoglobulins and Risk of Autism. *Pediatrics*. 2010 Sep 13. PubMed PMID: 20837594. Epub 2010/09/15. Eng.
43. Holton A, Weberling B, Clarke CE, Smith MJ. The Blame Frame: Media Attribution of Culpability About the MMR-Autism Vaccination Scare. *Health Commun*. 2012 Jan 11. PubMed PMID: 22236220. Epub 2012/01/13. Eng.
44. Demicheli V, Rivetti A, Debalini MG, Di Pietrantonj C. Vaccines for measles, mumps and rubella in children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;2:CD004407. PubMed PMID: 22336803. Epub 2012/02/18. eng.
45. Fombonne E, Chakrabarti S. No evidence for a new variant of measles-mumps-rubella-induced autism. *Pediatrics*. 2001 Oct;108(4):E58. PubMed PMID: 11581466. Epub 2001/10/03. eng.
46. Solt I, Bornstein J. [Childhood vaccines and autism--much ado about nothing?]. *Harefuah*. 2010 Apr;149(4):251-5, 60. PubMed PMID: 20812501. Epub 2010/09/04. heb.

47. Wakefield AJ, Murch SH, Anthony A, Linnell J, Casson DM, Malik M, et al. Ileal-lymphoid-nodular hyperplasia, non-specific colitis, and pervasive developmental disorder in children. *Lancet*. 1998 Feb 28;351(9103):637-41. PubMed PMID: 9500320. Epub 1998/03/21. eng.
48. Buie T, Campbell DB, Fuchs GJ, 3rd, Furuta GT, Levy J, Vandewater J, et al. Evaluation, diagnosis, and treatment of gastrointestinal disorders in individuals with ASDs: a consensus report. *Pediatrics*. 2010 Jan;125 Suppl 1:S1-18. PubMed PMID: 20048083. Epub 2010/02/06. eng.
49. Valicenti-McDermott M, McVicar K, Rapin I, Wershil BK, Cohen H, Shinnar S. Frequency of gastrointestinal symptoms in children with autistic spectrum disorders and association with family history of autoimmune disease. *J Dev Behav Pediatr*. 2006 Apr;27(2 Suppl):S128-36. PubMed PMID: 16685179. Epub 2006/05/11. eng.
50. de Magistris L, Familiari V, Pascotto A, Sapone A, Froli A, Iardino P, et al. Alterations of the intestinal barrier in patients with autism spectrum disorders and in their first-degree relatives. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010 Oct;51(4):418-24. PubMed PMID: 20683204. Epub 2010/08/05. eng.
51. Horvath K, Papadimitriou JC, Rabsztyrn A, Drachenberg C, Tildon JT. Gastrointestinal abnormalities in children with autistic disorder. *J Pediatr*. 1999 Nov;135(5):559-63. PubMed PMID: 10547242. Epub 1999/11/05. eng.
52. Walker-Smith J, Andrews J. Alpha-1-antitrypsin, autism, and coeliac

disease. *Lancet*. 1972 Oct 21;2(7782):883-4. PubMed PMID: 4116595. Epub 1972/10/21. eng.

53. Alberti A, Pirrone P, Elia M, Waring RH, Romano C. Sulphation deficit in "low-functioning" autistic children: a pilot study. *Biol Psychiatry*. 1999 Aug 1;46(3):420-4. PubMed PMID: 10435209. Epub 1999/08/06. eng.

54. Smith RA, Farnworth H, Wright B, Allgar V. Are there more bowel symptoms in children with autism compared to normal children and children with other developmental and neurological disorders?: A case control study. *Autism*. 2009 Jul;13(4):343-55. PubMed PMID: 19535465. Epub 2009/06/19. eng.

55. Sandhu B, Steer C, Golding J, Emond A. The early stool patterns of young children with autistic spectrum disorder. *Arch Dis Child*. 2009 Jul;94(7):497-500. PubMed PMID: 19329445. Epub 2009/03/31. eng.

56. Wang LW, Tancredi DJ, Thomas DW. The prevalence of gastrointestinal problems in children across the United States with autism spectrum disorders from families with multiple affected members. *J Dev Behav Pediatr*. 2011 Jun;32(5):351-60. PubMed PMID: 21555957. Epub 2011/05/11. eng.

57. Goodwin MS, Cowen MA, Goodwin TC. Malabsorption and cerebral dysfunction: a multivariate and comparative study of autistic children. *J Autism Child Schizophr*. 1971 Jan-Mar;1(1):48-62. PubMed PMID: 5172439. Epub 1971/01/01. eng.

58. Molloy CA, Manning-Courtney P. Prevalence of chronic gastrointestinal symptoms in children with autism and autistic spectrum disorders. *Autism*. 2003 Jun;7(2):165-71. PubMed PMID: 12846385. Epub 2003/07/09. eng.
59. Jyonouchi H, Geng L, Ruby A, Zimmerman-Bier B. Dysregulated innate immune responses in young children with autism spectrum disorders: their relationship to gastrointestinal symptoms and dietary intervention. *Neuropsychobiology*. 2005;51(2):77-85. PubMed PMID: 15741748. Epub 2005/03/03. eng.
60. Ibrahim SH, Voigt RG, Katusic SK, Weaver AL, Barbaresi WJ. Incidence of gastrointestinal symptoms in children with autism: a population-based study. *Pediatrics*. 2009 Aug;124(2):680-6. PubMed PMID: 19651585. Pubmed Central PMCID: 2747040. Epub 2009/08/05. eng.
61. Afzal N, Murch S, Thirrupathy K, Berger L, Fagbemi A, Heuschkel R. Constipation with acquired megarectum in children with autism. *Pediatrics*. 2003 Oct;112(4):939-42. PubMed PMID: 14523189. Epub 2003/10/03. eng.
62. Levy SE, Souders MC, Ittenbach RF, Giarelli E, Mulberg AE, Pinto-Martin JA. Relationship of dietary intake to gastrointestinal symptoms in children with autistic spectrum disorders. *Biol Psychiatry*. 2007 Feb 15;61(4):492-7. PubMed PMID: 17207470. Epub 2007/01/09. eng.
63. Nygaard HA. Pain in people with dementia and impaired verbal communication. *J Pain Palliat Care Pharmacother*. 2010 Dec;24(4):414-26.

PubMed PMID: 21133754. Epub 2010/12/08. eng.

64. Clements J, Wing L, Dunn G. Sleep problems in handicapped children: a preliminary study. *J Child Psychol Psychiatry*. 1986 May;27(3):399-407. PubMed PMID: 3733919. Epub 1986/05/01. eng.

65. Souders MC, Mason TB, Valladares O, Bucan M, Levy SE, Mandell DS, et al. Sleep behaviors and sleep quality in children with autism spectrum disorders. *Sleep*. 2009 Dec 1;32(12):1566-78. PubMed PMID: 20041592. Pubmed Central PMCID: 2786040. Epub 2010/01/01. eng.

66. Breau LM, Camfield CS. Pain disrupts sleep in children and youth with intellectual and developmental disabilities. *Res Dev Disabil*. 2011 Jun 9. PubMed PMID: 21664797. Epub 2011/06/15. Eng.

67. Nikolov RN, Bearss KE, Lettinga J, Erickson C, Rodowski M, Aman MG, et al. Gastrointestinal symptoms in a sample of children with pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord*. 2009 Mar;39(3):405-13. PubMed PMID: 18791817. Epub 2008/09/16. eng.

68. Galiatsatos P, Gologan A, Lamoureux E. Autistic enterocolitis: fact or fiction? *Can J Gastroenterol*. 2009 Feb;23(2):95-8. PubMed PMID: 19214283. Pubmed Central PMCID: 2694587. Epub 2009/02/14. eng.

69. Horvath K, Perman JA. Autistic disorder and gastrointestinal disease. *Curr Opin Pediatr*. 2002 Oct;14(5):583-7. PubMed PMID: 12352252. Epub

2002/09/28. eng.

70. Finegold SM, Dowd SE, Gontcharova V, Liu C, Henley KE, Wolcott RD, et al. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe*. 2010 Aug;16(4):444-53. PubMed PMID: 20603222. Epub 2010/07/07. eng.

71. Ekiel A, Aptekorz M, Kazek B, Wiechula B, Wilk I, Martirosian G. [Intestinal microflora of autistic children]. *Med Dosw Mikrobiol*. 2010;62(3):237-43. PubMed PMID: 21114016. Epub 2010/12/01. Mikroflora jelitowa dzieci autystycznych. pol.

72. Finegold SM, Molitoris D, Song Y, Liu C, Vaisanen ML, Bolte E, et al. Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. *Clin Infect Dis*. 2002 Sep 1;35(Suppl 1):S6-S16. PubMed PMID: 12173102. Epub 2002/08/13. eng.

73. Finegold SM. Therapy and epidemiology of autism--clostridial spores as key elements. *Med Hypotheses*. 2008;70(3):508-11. PubMed PMID: 17904761. Epub 2007/10/02. eng.

74. Song Y, Liu C, Finegold SM. Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children. *Appl Environ Microbiol*. 2004 Nov;70(11):6459-65. PubMed PMID: 15528506. Pubmed Central PMCID: 525120. Epub 2004/11/06. eng.

75. Parracho HM, Bingham MO, Gibson GR, McCartney AL. Differences

between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *J Med Microbiol.* 2005 Oct;54(Pt 10):987-91. PubMed PMID: 16157555. Epub 2005/09/15. eng.

76. Martirosian G, Ekiel A, Aptekorz M, Wiechula B, Kazek B, Jankowska-Steifer E, et al. Fecal lactoferrin and *Clostridium* spp. in stools of autistic children. *Anaerobe.* 2011 Feb;17(1):43-5. PubMed PMID: 21167951. Epub 2010/12/21. eng.

77. Yap IK, Angley M, Veselkov KA, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. Urinary metabolic phenotyping differentiates children with autism from their unaffected siblings and age-matched controls. *J Proteome Res.* 2010 Jun 4;9(6):2996-3004. PubMed PMID: 20337404. Epub 2010/03/27. eng.

78. Altieri L, Neri C, Sacco R, Curatolo P, Benvenuto A, Muratori F, et al. Urinary p-cresol is elevated in small children with severe autism spectrum disorder. *Biomarkers.* 2011 Feb 18. PubMed PMID: 21329489. Epub 2011/02/19. Eng.

79. Shaw W. Increased urinary excretion of a 3-(3-hydroxyphenyl)-3-hydroxypropionic acid (HPHPA), an abnormal phenylalanine metabolite of *Clostridia* spp. in the gastrointestinal tract, in urine samples from patients with autism and schizophrenia. *Nutr Neurosci.* 2010 Jun;13(3):135-43. PubMed PMID: 20423563. Epub 2010/04/29. eng.

80. Sandler RH, Finegold SM, Bolte ER, Buchanan CP, Maxwell AP,

Vaisanen ML, et al. Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. *J Child Neurol*. 2000 Jul;15(7):429-35. PubMed PMID: 10921511. Epub 2000/08/02. eng.

81. Jyonouchi H. Autism spectrum disorders and allergy: observation from a pediatric allergy/immunology clinic. *Expert Rev Clin Immunol*. 2010 May;6(3):397-411. PubMed PMID: 20441426. Epub 2010/05/06. eng.

82. Jyonouchi H. Food allergy and autism spectrum disorders: is there a link? *Curr Allergy Asthma Rep*. 2009 May;9(3):194-201. PubMed PMID: 19348719. Epub 2009/04/08. eng.

83. Enstrom A, Krakowiak P, Onore C, Pessah IN, Hertz-Picciotto I, Hansen RL, et al. Increased IgG4 levels in children with autism disorder. *Brain Behav Immun*. 2009 Mar;23(3):389-95. PubMed PMID: 19136055. Pubmed Central PMCID: 2696343. Epub 2009/01/13. eng.

84. Croonenberghs J, Wauters A, Devreese K, Verkerk R, Scharpe S, Bosmans E, et al. Increased serum albumin, gamma globulin, immunoglobulin IgG, and IgG2 and IgG4 in autism. *Psychol Med*. 2002 Nov;32(8):1457-63. PubMed PMID: 12455944. Epub 2002/11/29. eng.

85. Trajkovski V, Ajdinski L, Spiroski M. Plasma concentration of immunoglobulin classes and subclasses in children with autism in the Republic of Macedonia: retrospective study. *Croat Med J*. 2004 Dec;45(6):746-9. PubMed PMID: 15578810. Epub 2004/12/04. eng.

86. Warren RP, Margaretten NC, Pace NC, Foster A. Immune abnormalities in patients with autism. *J Autism Dev Disord*. 1986 Jun;16(2):189-97. PubMed PMID: 2941410. Epub 1986/06/01. eng.
87. Plioplys AV, Greaves A, Kazemi K, Silverman E. Lymphocyte function in autism and Rett syndrome. *Neuropsychobiology*. 1994;29(1):12-6. PubMed PMID: 8127418. Epub 1994/01/01. eng.
88. Denney DR, Frei BW, Gaffney GR. Lymphocyte subsets and interleukin-2 receptors in autistic children. *J Autism Dev Disord*. 1996 Feb;26(1):87-97. PubMed PMID: 8819772. Epub 1996/02/01. eng.
89. Hunter LC, O'Hare A, Herron WJ, Fisher LA, Jones GE. Opioid peptides and dipeptidyl peptidase in autism. *Dev Med Child Neurol*. 2003 Feb;45(2):121-8. PubMed PMID: 12578238. Epub 2003/02/13. eng.
90. Ashwood P, Wills S, Van de Water J. The immune response in autism: a new frontier for autism research. *J Leukoc Biol*. 2006 Jul;80(1):1-15. PubMed PMID: 16698940. Epub 2006/05/16. eng.
91. Saresella M, Marventano I, Guerini FR, Mancuso R, Ceresa L, Zanzottera M, et al. An autistic endophenotype results in complex immune dysfunction in healthy siblings of autistic children. *Biol Psychiatry*. 2009 Nov 15;66(10):978-84. PubMed PMID: 19699471. Epub 2009/08/25. eng.
92. Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah IN, Van de

Water J. Altered T cell responses in children with autism. *Brain Behav Immun*. 2010 Sep 16. PubMed PMID: 20833247. Epub 2010/09/14. Eng.

93. Mostafa GA, Al Shehab A, Fouad NR. Frequency of CD4+CD25high regulatory T cells in the peripheral blood of Egyptian children with autism. *J Child Neurol*. 2010 Mar;25(3):328-35. PubMed PMID: 19713552. Epub 2009/08/29. eng.

94. Ashwood P, Corbett BA, Kantor A, Schulman H, Van de Water J, Amaral DG. In search of cellular immunophenotypes in the blood of children with autism. *PLoS One*. 2011;6(5):e19299. PubMed PMID: 21573236. Pubmed Central PMCID: 3087757. Epub 2011/05/17. eng.

95. Stubbs EG, Crawford ML. Depressed lymphocyte responsiveness in autistic children. *J Autism Child Schizophr*. 1977 Mar;7(1):49-55. PubMed PMID: 139400. Epub 1977/03/01. eng.

96. Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah IN, Van de Water J. Altered T cell responses in children with autism. *Brain Behav Immun*. 2011 Jul;25(5):840-9. PubMed PMID: 20833247. Pubmed Central PMCID: 3039713. Epub 2010/09/14. eng.

97. Singh VK. Plasma increase of interleukin-12 and interferon-gamma. Pathological significance in autism. *J Neuroimmunol*. 1996 May;66(1-2):143-5. PubMed PMID: 8964908. Epub 1996/05/01. eng.

98. Gupta S, Aggarwal S, Rathanavaran B, Lee T. Th1- and Th2-like cytokines in CD4+ and CD8+ T cells in autism. *J Neuroimmunol*. 1998 May 1;85(1):106-9. PubMed PMID: 9627004. Epub 1998/06/17. eng.
99. McBride PA, Anderson GM, Hertzog ME, Snow ME, Thompson SM, Khait VD, et al. Effects of diagnosis, race, and puberty on platelet serotonin levels in autism and mental retardation. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1998 Jul;37(7):767-76. PubMed PMID: 9666633. Epub 1998/07/17. eng.
100. Jyonouchi H, Sun S, Le H. Proinflammatory and regulatory cytokine production associated with innate and adaptive immune responses in children with autism spectrum disorders and developmental regression. *J Neuroimmunol*. 2001 Nov 1;120(1-2):170-9. PubMed PMID: 11694332. Epub 2001/11/06. eng.
101. Croonenberghs J, Bosmans E, Deboutte D, Kenis G, Maes M. Activation of the inflammatory response system in autism. *Neuropsychobiology*. 2002;45(1):1-6. PubMed PMID: 11803234. Epub 2002/01/23. eng.
102. Molloy CA, Morrow AL, Meinzen-Derr J, Schleifer K, Dienger K, Manning-Courtney P, et al. Elevated cytokine levels in children with autism spectrum disorder. *J Neuroimmunol*. 2006 Mar;172(1-2):198-205. PubMed PMID: 16360218. Epub 2005/12/20. eng.
103. Corbett BA, Kantor AB, Schulman H, Walker WL, Lit L, Ashwood P, et al. A proteomic study of serum from children with autism showing differential

expression of apolipoproteins and complement proteins. *Mol Psychiatry*. 2007 Mar;12(3):292-306. PubMed PMID: 17189958. Epub 2006/12/27. eng.

104. Hranilovic D, Novak R, Babic M, Novokmet M, Bujas-Petkovic Z, Jernej B. Hyperserotonemia in autism: the potential role of 5HT-related gene variants. *Collegium antropologicum*. 2008 Jan;32 Suppl 1:75-80. PubMed PMID: 18405062.

105. Mostafa GA, El-Sherif DL, Hamza RT, A. AS. Hyperserotonemia in Egyptian autistic children: Relation to allergic manifestations *Journal of Pediatric Neurology* 2008;6:227–36.

106. Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah I, Van de Water J. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain Behav Immun*. 2010 Aug 10. PubMed PMID: 20705131. Epub 2010/08/14. Eng.

107. Kolevzon A, Newcorn JH, Kryzak L, Chaplin W, Watner D, Hollander E, et al. Relationship between whole blood serotonin and repetitive behaviors in autism. *Psychiatry Res*. 2010 Feb 28;175(3):274-6. PubMed PMID: 20044143. Pubmed Central PMCID: 2815211. Epub 2010/01/02. eng.

108. Suzuki K, Matsuzaki H, Iwata K, Kamenno Y, Shimmura C, Kawai S, et al. Plasma cytokine profiles in subjects with high-functioning autism spectrum disorders. *PLoS One*. 2011;6(5):e20470. PubMed PMID: 21647375. Pubmed

Central PMCID: 3103577. Epub 2011/06/08. eng.

109. Al-Ayadhi LY, Mostafa GA. Low plasma progranulin levels in children with autism. *J Neuroinflammation*. 2011;8:111. PubMed PMID: 21892962. Pubmed Central PMCID: 3182917. Epub 2011/09/07. eng.

110. Al-ayadhi LY, Mostafa GA. Increased serum osteopontin levels in autistic children: relation to the disease severity. *Brain Behav Immun*. 2011 Oct;25(7):1393-8. PubMed PMID: 21521652. Epub 2011/04/28. eng.

111. Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah I, Van de Water J. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain Behav Immun*. 2011 Jan;25(1):40-5. PubMed PMID: 20705131. Pubmed Central PMCID: 2991432. Epub 2010/08/14. eng.

112. Malik M, Sheikh AM, Wen G, Spivack W, Brown WT, Li X. Expression of inflammatory cytokines, Bcl2 and cathepsin D are altered in lymphoblasts of autistic subjects. *Immunobiology*. 2011 Jan-Feb;216(1-2):80-5. PubMed PMID: 20399529. Epub 2010/04/20. eng.

113. Sweeten TL, Posey DJ, McDougale CJ. High blood monocyte counts and neopterin levels in children with autistic disorder. *Am J Psychiatry*. 2003 Sep;160(9):1691-3. PubMed PMID: 12944347. Epub 2003/08/29. eng.

114. Enstrom AM, Onore CE, Van de Water JA, Ashwood P. Differential

monocyte responses to TLR ligands in children with autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun.* 2010 Jan;24(1):64-71. PubMed PMID: 19666104. Epub 2009/08/12. eng.

115. Renzoni E, Beltrami V, Sestini P, Pompella A, Menchetti G, Zappella M. Brief report: allergological evaluation of children with autism. *J Autism Dev Disord.* 1995 Jun;25(3):327-33. PubMed PMID: 7559298. Epub 1995/06/01. eng.

116. Measurement of specific and nonspecific IgG4 levels as diagnostic and prognostic tests for clinical allergy. AAAI Board of Directors. *J Allergy Clin Immunol.* 1995 Mar;95(3):652-4. PubMed PMID: 7779178. Epub 1995/03/01. eng.

117. Stapel SO, Asero R, Ballmer-Weber BK, Knol EF, Strobel S, Vieths S, et al. Testing for IgG4 against foods is not recommended as a diagnostic tool: EAACI Task Force Report. *Allergy.* 2008 Jul;63(7):793-6. PubMed PMID: 18489614. Epub 2008/05/21. eng.

118. Gupta S, Aggarwal S, Heads C. Dysregulated immune system in children with autism: beneficial effects of intravenous immune globulin on autistic characteristics. *J Autism Dev Disord.* 1996 Aug;26(4):439-52. PubMed PMID: 8863094. Epub 1996/08/01. eng.

119. Onore C, Careaga M, Ashwood P. The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. *Brain Behav Immun.* 2012 Mar;26(3):383-92.

PubMed PMID: 21906670. Pubmed Central PMCID: 3418145. Epub 2011/09/13. eng.

120. Mostafa GA, Kitchener N. Serum anti-nuclear antibodies as a marker of autoimmunity in Egyptian autistic children. *Pediatr Neurol*. 2009 Feb;40(2):107-12. PubMed PMID: 19135624. Epub 2009/01/13. eng.

121. Mostafa GA, Al-Ayadhi LY. The possible link between the elevated serum levels of neurokinin A and anti-ribosomal P protein antibodies in children with autism. *J Neuroinflammation*. 2011 Dec 21;8(1):180. PubMed PMID: 22189180. Epub 2011/12/23. Eng.

122. Chez MG, Dowling T, Patel PB, Khanna P, Kominsky M. Elevation of tumor necrosis factor-alpha in cerebrospinal fluid of autistic children. *Pediatr Neurol*. 2007 Jun;36(6):361-5. PubMed PMID: 17560496. Epub 2007/06/15. eng.

123. Cohly HH, Panja A. Immunological findings in autism. *Int Rev Neurobiol*. 2005;71:317-41. PubMed PMID: 16512356. Epub 2006/03/04. eng.

124. Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol*. 2005 Jan;57(1):67-81. PubMed PMID: 15546155. Epub 2004/11/17. eng.

125. Li X, Chauhan A, Sheikh AM, Patil S, Chauhan V, Li XM, et al. Elevated

immune response in the brain of autistic patients. J Neuroimmunol. 2009 Feb 15;207(1-2):111-6. PubMed PMID: 19157572. Pubmed Central PMCID: 2770268. Epub 2009/01/23. eng.

126. Zimmerman AW, Jyonouchi H, Comi AM, Connors SL, Milstien S, Varsou A, et al. Cerebrospinal fluid and serum markers of inflammation in autism. Pediatr Neurol. 2005 Sep;33(3):195-201. PubMed PMID: 16139734. Epub 2005/09/06. eng.

127. Banks WA. The blood-brain barrier in psychoneuroimmunology. Immunol Allergy Clin North Am. 2009 May;29(2):223-8. PubMed PMID: 19389578. Epub 2009/04/25. eng.

128. Sheikh AM, Li X, Wen G, Tauqeer Z, Brown WT, Malik M. Cathepsin D and apoptosis related proteins are elevated in the brain of autistic subjects. Neuroscience. 2010 Jan 20;165(2):363-70. PubMed PMID: 19854241. Epub 2009/10/27. eng.

129. Pardo CA, Vargas DL, Zimmerman AW. Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism. Int Rev Psychiatry. 2005 Dec;17(6):485-95. PubMed PMID: 16401547. Epub 2006/01/13. eng.

130. Singh VK, Lin SX, Yang VC. Serological association of measles virus and human herpesvirus-6 with brain autoantibodies in autism. Clin Immunol Immunopathol. 1998 Oct;89(1):105-8. PubMed PMID: 9756729. Epub 1998/10/03. eng.

131. Singh VK, Warren R, Averett R, Ghaziuddin M. Circulating autoantibodies to neuronal and glial filament proteins in autism. *Pediatr Neurol.* 1997 Jul;17(1):88-90. PubMed PMID: 9308986. Epub 1997/07/01. eng.
132. Silva SC, Correia C, Fesel C, Barreto M, Coutinho AM, Marques C, et al. Autoantibody repertoires to brain tissue in autism nuclear families. *J Neuroimmunol.* 2004 Jul;152(1-2):176-82. PubMed PMID: 15223250. Epub 2004/06/30. eng.
133. Cabanlit M, Wills S, Goines P, Ashwood P, Van de Water J. Brain-specific autoantibodies in the plasma of subjects with autistic spectrum disorder. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Jun;1107:92-103. PubMed PMID: 17804536. Epub 2007/09/07. eng.
134. Connolly AM, Chez M, Streif EM, Keeling RM, Golumbek PT, Kwon JM, et al. Brain-derived neurotrophic factor and autoantibodies to neural antigens in sera of children with autistic spectrum disorders, Landau-Kleffner syndrome, and epilepsy. *Biol Psychiatry.* 2006 Feb 15;59(4):354-63. PubMed PMID: 16181614. Epub 2005/09/27. eng.
135. Kozlovskaja GV, Kliushnik TP, Goriunova AV, Turkova IL, Kalinina MA, Sergienko NS. [Nerve growth factor auto-antibodies in children with various forms of mental dysontogenesis and in schizophrenia high risk group]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova.* 2000;100(3):50-2. PubMed PMID: 10758649. Epub 2000/04/12. Autoantitela k faktoru rosta nervov u detei s razlichnymi formami psikhicheskogo dizontogeneza i iz gruppy vysokogo riska

po shizofrenii. rus.

136. Singh VK, Rivas WH. Prevalence of serum antibodies to caudate nucleus in autistic children. *Neurosci Lett*. 2004 Jan 23;355(1-2):53-6. PubMed PMID: 14729233. Epub 2004/01/20. eng.

137. Mostafa GA, El-Hadidi ES, Hewedi DH, Abdou MM. Oxidative stress in Egyptian children with autism: relation to autoimmunity. *J Neuroimmunol*. 2010 Feb 26;219(1-2):114-8. PubMed PMID: 20036015. Epub 2009/12/29. eng.

138. Mostafa GA, Al-Ayadhi LY. The relationship between the increased frequency of serum antineuronal antibodies and the severity of autism in children. *Eur J Paediatr Neurol*. 2012 Jan 5. PubMed PMID: 22226851. Epub 2012/01/10. Eng.

139. Mostafa GA, Al-Ayadhi LY. Increased serum levels of anti-ganglioside M1 auto-antibodies in autistic children: relation to the disease severity. *J Neuroinflammation*. 2011;8:39. PubMed PMID: 21513576. Pubmed Central PMCID: 3104945. Epub 2011/04/26. eng.

140. Mostafa GA, El-Sayed ZA, El-Aziz MM, El-Sayed MF. Serum anti-myelin-associated glycoprotein antibodies in Egyptian autistic children. *J Child Neurol*. 2008 Dec;23(12):1413-8. PubMed PMID: 19073846. Epub 2008/12/17. eng.

141. Singh VK, Warren RP, Odell JD, Warren WL, Cole P. Antibodies to myelin basic protein in children with autistic behavior. *Brain Behav Immun*. 1993

Mar;7(1):97-103. PubMed PMID: 7682457. Epub 1993/03/01. eng.

142. Mostafa GA, Al-Ayadhi LY. A lack of association between hyperserotonemia and the increased frequency of serum anti-myelin basic protein auto-antibodies in autistic children. *J Neuroinflammation*. 2011;8:71. PubMed PMID: 21696608. Pubmed Central PMCID: 3142225. Epub 2011/06/24. eng.

143. Hranilovic D, Bujas-Petkovic Z, Vragovic R, Vuk T, Hock K, Jernej B. Hyperserotonemia in adults with autistic disorder. *J Autism Dev Disord*. 2007 Nov;37(10):1934-40. PubMed PMID: 17165147. Epub 2006/12/14. eng.

144. Heuer L, Ashwood P, Schauer J, Goines P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, et al. Reduced levels of immunoglobulin in children with autism correlates with behavioral symptoms. *Autism Res*. 2008 Oct;1(5):275-83. PubMed PMID: 19343198. Pubmed Central PMCID: 2663897. Epub 2009/04/04. eng.

145. Grigorenko EL, Han SS, Yrigollen CM, Leng L, Mizue Y, Anderson GM, et al. Macrophage migration inhibitory factor and autism spectrum disorders. *Pediatrics*. 2008 Aug;122(2):e438-45. PubMed PMID: 18676531. Epub 2008/08/05. eng.

146. Ashwood P, Enstrom A, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen RL, Croen LA, et al. Decreased transforming growth factor beta1 in autism: a potential link between immune dysregulation and impairment in clinical behavioral outcomes. *J Neuroimmunol*. 2008 Nov 15;204(1-2):149-53. PubMed

PMID: 18762342. Pubmed Central PMCID: 2615583. Epub 2008/09/03. eng.

147. Iwata Y, Tsuchiya KJ, Mikawa S, Nakamura K, Takai Y, Suda S, et al. Serum levels of P-selectin in men with high-functioning autism. *Br J Psychiatry*. 2008 Oct;193(4):338-9. PubMed PMID: 18827301. Epub 2008/10/02. eng.

148. Onore C, Enstrom A, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Van de Water J, et al. Decreased cellular IL-23 but not IL-17 production in children with autism spectrum disorders. *J Neuroimmunol*. 2009 Nov 30;216(1-2):126-9. PubMed PMID: 19800697. Pubmed Central PMCID: 2981175. Epub 2009/10/06. eng.

149. Goines P, Van de Water J. The immune system's role in the biology of autism. *Curr Opin Neurol*. 2010 Apr;23(2):111-7. PubMed PMID: 20160651. Pubmed Central PMCID: 2898160. Epub 2010/02/18. eng.

150. Kajizuka M, Miyachi T, Matsuzaki H, Iwata K, Shinmura C, Suzuki K, et al. Serum levels of platelet-derived growth factor BB homodimers are increased in male children with autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010 Feb 1;34(1):154-8. PubMed PMID: 19879307. Epub 2009/11/03. eng.

151. Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah IN, Van de Water J. Associations of impaired behaviors with elevated plasma chemokines in autism spectrum disorders. *J Neuroimmunol*. 2011 Mar;232(1-2):196-9. PubMed PMID: 21095018. Pubmed Central PMCID: 3053074. Epub 2010/11/26. eng.

152. Goines P, Haapanen L, Boyce R, Duncanson P, Braunschweig D, Delwiche L, et al. Autoantibodies to cerebellum in children with autism associate with behavior. *Brain Behav Immun*. 2011 Mar;25(3):514-23. PubMed PMID: 21134442. Pubmed Central PMCID: 3039058. Epub 2010/12/08. eng.
153. Torrente F, Anthony A, Heuschkel RB, Thomson MA, Ashwood P, Murch SH. Focal-enhanced gastritis in regressive autism with features distinct from Crohn's and *Helicobacter pylori* gastritis. *Am J Gastroenterol*. 2004 Apr;99(4):598-605. PubMed PMID: 15089888. Epub 2004/04/20. eng.
154. Furlano RI, Anthony A, Day R, Brown A, McGarvey L, Thomson MA, et al. Colonic CD8 and gamma delta T-cell infiltration with epithelial damage in children with autism. *J Pediatr*. 2001 Mar;138(3):366-72. PubMed PMID: 11241044. Epub 2001/03/10. eng.
155. Torrente F, Ashwood P, Day R, Machado N, Furlano RI, Anthony A, et al. Small intestinal enteropathy with epithelial IgG and complement deposition in children with regressive autism. *Mol Psychiatry*. 2002;7(4):375-82, 34. PubMed PMID: 11986981. Epub 2002/05/03. eng.
156. Ashwood P, Anthony A, Pellicer AA, Torrente F, Walker-Smith JA, Wakefield AJ. Intestinal lymphocyte populations in children with regressive autism: evidence for extensive mucosal immunopathology. *J Clin Immunol*. 2003 Nov;23(6):504-17. PubMed PMID: 15031638. Epub 2004/03/20. eng.
157. Ashwood P, Anthony A, Torrente F, Wakefield AJ. Spontaneous mucosal

lymphocyte cytokine profiles in children with autism and gastrointestinal symptoms: mucosal immune activation and reduced counter regulatory interleukin-10. *J Clin Immunol.* 2004 Nov;24(6):664-73. PubMed PMID: 15622451. Epub 2004/12/29. eng.

158. Ashwood P, Wakefield AJ. Immune activation of peripheral blood and mucosal CD3+ lymphocyte cytokine profiles in children with autism and gastrointestinal symptoms. *J Neuroimmunol.* 2006 Apr;173(1-2):126-34. PubMed PMID: 16494951. Epub 2006/02/24. eng.

159. Jyonouchi H, Sun S, Itokazu N. Innate immunity associated with inflammatory responses and cytokine production against common dietary proteins in patients with autism spectrum disorder. *Neuropsychobiology.* 2002;46(2):76-84. PubMed PMID: 12378124. Epub 2002/10/16. eng.

160. Lucarelli S, Frediani T, Zingoni AM, Ferruzzi F, Giardini O, Quintieri F, et al. Food allergy and infantile autism. *Panminerva Med.* 1995 Sep;37(3):137-41. PubMed PMID: 8869369. Epub 1995/09/01. eng.

161. Kawashti MI, Amin OR, Roweby NG. Possible immunological disorders in autism: concomitant autoimmunity and immune tolerance. *Egypt J Immunol.* 2006;13(1):99-104. PubMed PMID: 17974154. Epub 2007/11/03. eng.

162. Reichelt KL, Knivsberg AM. Can the pathophysiology of autism be explained by the nature of the discovered urine peptides? *Nutr Neurosci.* 2003 Feb;6(1):19-28. PubMed PMID: 12608733. Epub 2003/03/01. eng.

163. Farrell HM, Jr., Jimenez-Flores R, Bleck GT, Brown EM, Butler JE, Creamer LK, et al. Nomenclature of the proteins of cows' milk--sixth revision. *J Dairy Sci.* 2004 Jun;87(6):1641-74. PubMed PMID: 15453478. Epub 2004/09/30. eng.
164. Jinsmaa Y, Yoshikawa M. Enzymatic release of neocasomorphin and beta-casomorphin from bovine beta-casein. *Peptides.* 1999;20(8):957-62. PubMed PMID: 10503774. Epub 1999/09/30. eng.
165. Gardner ML. Amino acid and peptide absorption from partial digests of proteins in isolated rat small intestine. *The Journal of physiology.* 1978 Nov;284:83-104. PubMed PMID: 731590. Pubmed Central PMCID: 1282810.
166. Svedberg J, de Haas J, Leimenstoll G, Paul F, Teschemacher H. Demonstration of beta-casomorphin immunoreactive materials in in vitro digests of bovine milk and in small intestine contents after bovine milk ingestion in adult humans. *Peptides.* 1985 Sep-Oct;6(5):825-30. PubMed PMID: 4080604. Epub 1985/09/01. eng.
167. Read LC, Lord AP, Brantl V, Koch G. Absorption of beta-casomorphins from autoperfused lamb and piglet small intestine. *Am J Physiol.* 1990 Sep;259(3 Pt 1):G443-52. PubMed PMID: 2399987. Epub 1990/09/01. eng.
168. McLachlan CN. beta-casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. *Med Hypotheses.* 2001 Feb;56(2):262-72. PubMed PMID: 11425301. Epub 2001/06/27. eng.

169. Laugesen M, Elliott R. Ischaemic heart disease, Type 1 diabetes, and cow milk A1 beta-casein. *N Z Med J*. 2003 Jan 24;116(1168):U295. PubMed PMID: 12601419. Epub 2003/02/26. eng.
170. Meisel H. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *Biofactors*. 2004;21(1-4):55-61. PubMed PMID: 15630170. Epub 2005/01/05. eng.
171. Meisel H, FitzGerald RJ. Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences. *Br J Nutr*. 2000 Nov;84 Suppl 1:S27-31. PubMed PMID: 11242443. Epub 2001/03/10. eng.
172. Allescher HD, Storr M, Piller C, Brantl V, Schusdzarra V. Effect of opioid active therapeutics on the ascending reflex pathway in the rat ileum. *Neuropeptides*. 2000 Jun-Aug;34(3-4):181-6. PubMed PMID: 11021978. Epub 2000/10/07. eng.
173. Shahbazian A, Heinemann A, Schmidhammer H, Beubler E, Holzer-Petsche U, Holzer P. Involvement of mu- and kappa-, but not delta-, opioid receptors in the peristaltic motor depression caused by endogenous and exogenous opioids in the guinea-pig intestine. *Br J Pharmacol*. 2002 Feb;135(3):741-50. PubMed PMID: 11834622. Pubmed Central PMCID: 1573189. Epub 2002/02/09. eng.
174. MacDonald RS, Thornton WH, Jr., Marshall RT. A cell culture model to identify biologically active peptides generated by bacterial hydrolysis of casein. *J Dairy Sci*. 1994 May;77(5):1167-75. PubMed PMID: 8046061. Epub

1994/05/01. eng.

175. Froetschel MA. Bioactive peptides in digesta that regulate gastrointestinal function and intake. *J Anim Sci.* 1996 Oct;74(10):2500-8. PubMed PMID: 8904720. Epub 1996/10/01. eng.

176. Tome D, Dumontier AM, Hautefeuille M, Desjeux JF. Opiate activity and transepithelial passage of intact beta-casomorphins in rabbit ileum. *Am J Physiol.* 1987 Dec;253(6 Pt 1):G737-44. PubMed PMID: 3425715. Epub 1987/12/01. eng.

177. Mahe S, Tome D, Dumontier AM, Desjeux JF. Absorption of intact beta-casomorphins (beta-CM) in rabbit ileum in vitro. *Reprod Nutr Dev.* 1989;29(6):725-33. PubMed PMID: 2629778. Epub 1989/01/01. eng.

178. Claustre J, Toumi F, Trompette A, Jourdan G, Guignard H, Chayvialle JA, et al. Effects of peptides derived from dietary proteins on mucus secretion in rat jejunum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002 Sep;283(3):G521-8. PubMed PMID: 12181163. Epub 2002/08/16. eng.

179. Gill HS, Doull F, Rutherfurd KJ, Cross ML. Immunoregulatory peptides in bovine milk. *Br J Nutr.* 2000 Nov;84 Suppl 1:S111-7. PubMed PMID: 11242455. Epub 2001/03/10. eng.

180. Hollosi M, Suli-Vargha H, Medzihradzsky K, Fasman GD, Kunos G, Graf L. Structural determinants of the binding of gliadin fragments to human

peripheral blood lymphocytes. *Neuropeptides*. 1990 Nov;17(3):111-6. PubMed PMID: 2084575. Epub 1990/11/01. eng.

181. Akhalaya MY, Baizhumanov AA, Graevskaya EE. Effects of taurine, carnosine, and casomorphine on functional activity of rat peritoneal mast cells. *Bull Exp Biol Med*. 2006 Mar;141(3):328-30. PubMed PMID: 17073151. Epub 2006/11/01. eng.

182. Kurek M, Przybilla B, Hermann K, Ring J. A naturally occurring opioid peptide from cow's milk, beta-casomorphine-7, is a direct histamine releaser in man. *Int Arch Allergy Immunol*. 1992;97(2):115-20. PubMed PMID: 1374738. Epub 1992/01/01. eng.

183. Gattegno L, Migliore-Samour D, Saffar L, Jolles P. Enhancement of phagocytic activity of human monocytic-macrophagic cells by immunostimulating peptides from human casein. *Immunol Lett*. 1988 May;18(1):27-31. PubMed PMID: 3378828. Epub 1988/05/01. eng.

184. Migliore-Samour D, Roch-Arveiller M, Tissot M, Jazziri M, Keddad K, Giroud JP, et al. Effects of tripeptides derived from milk proteins on polymorphonuclear oxidative and phosphoinositide metabolisms. *Biochem Pharmacol*. 1992 Aug 18;44(4):673-80. PubMed PMID: 1324681. Epub 1992/08/18. eng.

185. Takahashi M, Moriguchi S, Suganuma H, Shiota A, Tani F, Usui H, et al. Identification of casoxin C, an ileum-contracting peptide derived from bovine

kappa-casein, as an agonist for C3a receptors. *Peptides*. 1997;18(3):329-36.
PubMed PMID: 9145417. Epub 1997/01/01. eng.

186. Kayser H, Meisel H. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Lett*. 1996 Mar 25;383(1-2):18-20. PubMed PMID: 8612782. Epub 1996/03/25. eng.

187. Elitsur Y, Luk GD. Beta-casomorphin (BCM) and human colonic lamina propria lymphocyte proliferation. *Clin Exp Immunol*. 1991 Sep;85(3):493-7. PubMed PMID: 1893631. Pubmed Central PMCID: 1535619. Epub 1991/09/01. eng.

188. Teschemacher H. Opioid receptor ligands derived from food proteins. *Curr Pharm Des*. 2003;9(16):1331-44. PubMed PMID: 12769741. Epub 2003/05/29. eng.

189. Kampa M, Loukas S, Hatzoglou A, Martin P, Martin PM, Castanas E. Identification of a novel opioid peptide (Tyr-Val-Pro-Phe-Pro) derived from human alpha S1 casein (alpha S1-casomorphin, and alpha S1-casomorphin amide). *Biochem J*. 1996 Nov 1;319 (Pt 3):903-8. PubMed PMID: 8920997. Pubmed Central PMCID: 1217873. Epub 1996/11/01. eng.

190. Koch G, Wiedemann K, Teschemacher H. Opioid activities of human beta-casomorphins. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1985 Dec;331(4):351-4. PubMed PMID: 3005882. Epub 1985/12/01. eng.

191. Caporale C, Fontanella A, Petrilli P, Pucci P, Molinaro MF, Picone D, et al. Isolation and characterization of dipeptidyl peptidase IV from human meconium. Functional role of beta-casomorphins. *FEBS Lett.* 1985 May 20;184(2):273-7. PubMed PMID: 2860011. Epub 1985/05/20. eng.
192. Watanabe Y, Kojima-Komatsu T, Iwaki-Egawa S, Fujimoto Y. Increased excretion of proline-containing peptides in dipeptidyl peptidase IV-deficient rats. *Research communications in chemical pathology and pharmacology.* 1993 Sep;81(3):323-30. PubMed PMID: 8235066.
193. D'Eufemia P, Celli M, Finocchiaro R, Pacifico L, Viozzi L, Zaccagnini M, et al. Abnormal intestinal permeability in children with autism. *Acta Paediatr.* 1996 Sep;85(9):1076-9. PubMed PMID: 8888921. Epub 1996/09/01. eng.
194. Robertson MA, Sigalet DL, Holst JJ, Meddings JB, Wood J, Sharkey KA. Intestinal permeability and glucagon-like peptide-2 in children with autism: a controlled pilot study. *J Autism Dev Disord.* 2008 Jul;38(6):1066-71. PubMed PMID: 18311517. Epub 2008/03/04. eng.
195. van Elburg RM, Uil JJ, Mulder CJ, Heymans HS. Intestinal permeability in patients with coeliac disease and relatives of patients with coeliac disease. *Gut.* 1993 Mar;34(3):354-7. PubMed PMID: 8472983. Pubmed Central PMCID: 1374141. Epub 1993/03/01. eng.
196. Marsilio R, D'Antiga L, Zancan L, Dussini N, Zacchello F. Simultaneous HPLC determination with light-scattering detection of lactulose and mannitol in

studies of intestinal permeability in pediatrics. Clin Chem. 1998 Aug;44(8 Pt 1):1685-91. PubMed PMID: 9702956. Epub 1998/08/14. eng.

197. Detel D, Persic M, Varljen J. Serum and intestinal dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) activity in children with celiac disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2007 Jul;45(1):65-70. PubMed PMID: 17592366. Epub 2007/06/27. eng.

198. Jarmolowska B, Bielikowicz K, Iwan M, Sidor K, Kostyra E, Kaczmarek M. Serum activity of dipeptidyl peptidase IV (DPPIV; EC 3.4.14.5) in breast-fed infants with symptoms of allergy. Peptides. 2007 Mar;28(3):678-82. PubMed PMID: 17204353. Epub 2007/01/06. eng.

199. Wasilewska J, Sienkiewicz-Szlapka E, Kuzbida E, Jarmolowska B, Kaczmarek M, Kostyra E. The exogenous opioid peptides and DPPIV serum activity in infants with apnoea expressed as apparent life threatening events (ALTE). Neuropeptides. 2011 Feb 18. PubMed PMID: 21334743. Epub 2011/02/22. Eng.

200. Elgun S, Keskinoglu A, Kumbasar H. Dipeptidyl peptidase IV and adenosine deaminase activity. Decrease in depression. Psychoneuroendocrinology. 1999 Nov;24(8):823-32. PubMed PMID: 10581653. Epub 1999/12/03. eng.

201. Maes M, De Meester I, Scharpe S, Desnyder R, Ranjan R, Meltzer HY. Alterations in plasma dipeptidyl peptidase IV enzyme activity in depression and schizophrenia: effects of antidepressants and antipsychotic drugs. Acta

Psychiatr Scand. 1996 Jan;93(1):1-8. PubMed PMID: 8919323. Epub 1996/01/01. eng.

202. Vojdani A, Bazargan M, Vojdani E, Samadi J, Nourian AA, Eghbalieh N, et al. Heat shock protein and gliadin peptide promote development of peptidase antibodies in children with autism and patients with autoimmune disease. Clin Diagn Lab Immunol. 2004 May;11(3):515-24. PubMed PMID: 15138176. Pubmed Central PMCID: 404567. Epub 2004/05/13. eng.

203. Moles A, Kieffer BL, D'Amato FR. Deficit in attachment behavior in mice lacking the mu-opioid receptor gene. Science. 2004 Jun 25;304(5679):1983-6. PubMed PMID: 15218152. Epub 2004/06/26. eng.

204. Wohr M, Moles A, Schwarting RK, D'Amato FR. Lack of social exploratory activation in male mu-opioid receptor KO mice in response to playback of female ultrasonic vocalizations. Soc Neurosci. 2010 May 24:1-12. PubMed PMID: 20503133. Epub 2010/05/27. Eng.

205. Dubynin VA, Malinovskaia IV, Beliaeva Iu A, Stovolosov IS, Beshpalova Zh D, Andreeva LA, et al. [Delayed effect of exorphins on learning of albino rat pups]. Izv Akad Nauk Ser Biol. 2008 Jan-Feb(1):53-60. PubMed PMID: 18491562. Epub 2008/05/22. rus.

206. Panksepp J, Normansell L, Siviy S, Rossi J, 3rd, Zolovick AJ. Casomorphins reduce separation distress in chicks. Peptides. 1984 Jul-Aug;5(4):829-31. PubMed PMID: 6541784. Epub 1984/07/01. eng.

207. Panksepp J, Nelson E, Siviy S. Brain opioids and mother-infant social motivation. *Acta Paediatr Suppl.* 1994 Jun;397:40-6. PubMed PMID: 7981473. Epub 1994/06/01. eng.
208. Dubynin VA, Ivleva Iu A, Beliaeva Iu A, Dobriakova Iu V, Andreeva LA, Kamenskii AA. [Influence of acute and chronic administrations of beta-casomorphins on the maternal motivation in albino rats]. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova.* 2005 Jan;91(1):80-8. PubMed PMID: 15773583. Epub 2005/03/19. rus.
209. Panksepp J, Najam N, Soares F. Morphine reduces social cohesion in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1979 Aug;11(2):131-4. PubMed PMID: 504292. Epub 1979/08/01. eng.
210. Fiat AM, Migliore-Samour D, Jolles P, Drouet L, Bal dit Sollier C, Caen J. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *J Dairy Sci.* 1993 Jan;76(1):301-10. PubMed PMID: 8436680. Epub 1993/01/01. eng.
211. Sakaguchi M, Koseki M, Wakamatsu M, Matsumura E. Effects of systemic administration of beta-casomorphin-5 on learning and memory in mice. *Eur J Pharmacol.* 2006 Jan 13;530(1-2):81-7. PubMed PMID: 16360145. Epub 2005/12/20. eng.
212. Gritsai OB, Dubynin VA, Pilipenko VE, Petrov OP, Andreeva LA. The effects of beta-casomorphine-7 and naloxone on the locomotor defense

response of the cockroach *Periplaneta americana* to electrical stimulation. Dokl Biochem. 2000 Nov-Dec;375:245-7. PubMed PMID: 11296481. Epub 2001/04/12. eng.

213. Dubynin VA, Zemskaya N, Ivleva IA, Kamenskii AA, Andreeva LA, Miasoedov NF. [Behavioural effects of beta-casomorphin-7 in its intranasal administration]. Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova. 2004 May-Jun;54(3):373-81. PubMed PMID: 15326952. Epub 2004/08/26. Povedenceskie efekty beta-kazomorfina-7 pri intranazal'nom vvedenii. rus.

214. Dobryakova YV, Dubynin VA, Ivleva YA, Belyaeva YA, Kamenskii AA. Effect of opioid antagonist naloxone on maternal motivation in albino rats. Bull Exp Biol Med. 2005 Jul;140(1):10-2. PubMed PMID: 16254608. Epub 2005/10/29. eng.

215. Burgdorf J, Panksepp J. Tickling induces reward in adolescent rats. Physiol Behav. 2001 Jan;72(1-2):167-73. PubMed PMID: 11239994. Epub 2001/03/10. eng.

216. Dubynin VA, Ivleva YA, Stovolosov IS, Belyaeva YA, Dobryakova YV, Andreeva LA, et al. Effect of beta-casomorphines on mother-oriented ("child's") behavior of white rats. Dokl Biol Sci. 2007 Jan-Feb;412:1-4. PubMed PMID: 17515027. Epub 2007/05/23. eng.

217. Dohan FC, Harper EH, Clark MH, Rodrigue RB, Zigas V. Is schizophrenia rare if grain is rare? Biol Psychiatry. 1984 Mar;19(3):385-99. PubMed PMID:

6609726. Epub 1984/03/01. eng.

218. Trygstad OE, Reichelt KL, Foss I, Edminson PD, Saelid G, Bremer J, et al. Patterns of peptides and protein-associated-peptide complexes in psychiatric disorders. *Br J Psychiatry*. 1980 Jan;136:59-72. PubMed PMID: 7357223. Epub 1980/01/01. eng.

219. Seim AR, Reichelt KL. An enzyme/brain-barrier theory of psychiatric pathogenesis: unifying observations on phenylketonuria, autism, schizophrenia and postpartum psychosis. *Med Hypotheses*. 1995 Nov;45(5):498-502. PubMed PMID: 8748095. Epub 1995/11/01. eng.

220. Sahley TL, Panksepp J. Brain opioids and autism: an updated analysis of possible linkages. *J Autism Dev Disord*. 1987 Jun;17(2):201-16. PubMed PMID: 3038836. Epub 1987/06/01. eng.

221. Knivsberg AM, Reichelt KL, Høien T, Nodland M. A randomised, controlled study of dietary intervention in autistic syndromes. *Nutr Neurosci*. 2002 Sep;5(4):251-61. PubMed PMID: 12168688. Epub 2002/08/10. eng.

222. Hsu CL, Lin CY, Chen CL, Wang CM, Wong MK. The effects of a gluten and casein-free diet in children with autism: a case report. *Chang Gung Med J*. 2009 Jul-Aug;32(4):459-65. PubMed PMID: 19664354. Epub 2009/08/12. eng.

223. Genuis SJ, Bouchard TP. Celiac disease presenting as autism. *J Child Neurol*. 2010 Jan;25(1):114-9. PubMed PMID: 19564647. Epub 2009/07/01.

eng.

224. Whiteley P, Haracopos D, Knivsberg AM, Reichelt KL, Parlar S, Jacobsen J, et al. The ScanBrit randomised, controlled, single-blind study of a gluten- and casein-free dietary intervention for children with autism spectrum disorders. *Nutr Neurosci*. 2010 Apr;13(2):87-100. PubMed PMID: 20406576. Epub 2010/04/22. eng.

225. McCarthy DM, Coleman M. Response of intestinal mucosa to gluten challenge in autistic subjects. *Lancet*. 1979 Oct 27;2(8148):877-8. PubMed PMID: 90968. Epub 1979/10/27. eng.

226. Knivsber AM, Reichelt KL, Nodland M. Reports on dietary intervention in autistic disorders. *Nutr Neurosci*. 2001;4(1):25-37. PubMed PMID: 11842874. Epub 2002/02/15. eng.

227. Sponheim E. [Gluten-free diet in infantile autism. A therapeutic trial]. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 1991 Feb 28;111(6):704-7. PubMed PMID: 2008691. Epub 1991/02/28. Glutenfri diett ved infantil autisme. Et behandlingsforsok. nor.

228. Elder JH, Shankar M, Shuster J, Theriaque D, Burns S, Sherrill L. The gluten-free, casein-free diet in autism: results of a preliminary double blind clinical trial. *J Autism Dev Disord*. 2006 Apr;36(3):413-20. PubMed PMID: 16555138. Epub 2006/03/24. eng.

229. Millward C, Ferriter M, Calver S, Connell-Jones G. Gluten- and casein-

free diets for autistic spectrum disorder. Cochrane Database Syst Rev. 2004 (2):CD003498. PubMed PMID: 15106205. Epub 2004/04/24. eng.

230. Millward C, Ferriter M, Calver S, Connell-Jones G. Gluten- and casein-free diets for autistic spectrum disorder. Cochrane Database Syst Rev. 2008 (2):CD003498. PubMed PMID: 18425890. Epub 2008/04/22. eng.

231. Garvey J. Diet in autism and associated disorders. J Fam Health Care. 2002;12(2):34-8. PubMed PMID: 12415751. Epub 2002/11/06. eng.

232. Peregrin T. Registered dietitians' insights in treating autistic children. J Am Diet Assoc. 2007 May;107(5):727-30. PubMed PMID: 17467361. Epub 2007/05/01. eng.

233. Bowers L. An audit of referrals of children with autistic spectrum disorder to the dietetic service. J Hum Nutr Diet. 2002 Apr;15(2):141-4. PubMed PMID: 11972743. Epub 2002/04/26. eng.

234. Hjiej H, Doyen C, Couprie C, Kaye K, Contejean Y. [Substitutive and dietetic approaches in childhood autistic disorder: interests and limits]. Encephale. 2008 Oct;34(5):496-503. PubMed PMID: 19068339. Epub 2008/12/11. Approches substitutive et dietetique du trouble autistique de l'enfant : interets ou limites ? fre.

235. Cermak SA, Curtin C, Bandini LG. Food selectivity and sensory sensitivity in children with autism spectrum disorders. J Am Diet Assoc. 2010

Feb;110(2):238-46. PubMed PMID: 20102851. Epub 2010/01/28. eng.

236. Bandini LG, Anderson SE, Curtin C, Cermak S, Evans EW, Scampini R, et al. Food selectivity in children with autism spectrum disorders and typically developing children. *J Pediatr*. 2010 Aug;157(2):259-64. PubMed PMID: 20362301. Pubmed Central PMCID: 2936505. Epub 2010/04/07. eng.

237. Lockner DW, Crowe TK, Skipper BJ. Dietary intake and parents' perception of mealtime behaviors in preschool-age children with autism spectrum disorder and in typically developing children. *J Am Diet Assoc*. 2008 Aug;108(8):1360-3. PubMed PMID: 18656577. Epub 2008/07/29. eng.

238. Emond A, Emmett P, Steer C, Golding J. Feeding symptoms, dietary patterns, and growth in young children with autism spectrum disorders. *Pediatrics*. 2010 Aug;126(2):e337-42. PubMed PMID: 20643716. Epub 2010/07/21. eng.

239. Ahearn WH, Castine T, Nault K, Green G. An assessment of food acceptance in children with autism or pervasive developmental disorder-not otherwise specified. *J Autism Dev Disord*. 2001 Oct;31(5):505-11. PubMed PMID: 11794415. Epub 2002/01/17. eng.

240. Goday P. Whey watchers and wheat watchers: the case against gluten and casein in autism. *Nutr Clin Pract*. 2008 Dec-2009 Jan;23(6):581-2. PubMed PMID: 19033216. Epub 2008/11/27. eng.

241. Zimmer MH, Hart LC, Manning-Courtney P, Murray DS, Bing NM, Summer S. Food Variety as a Predictor of Nutritional Status Among Children with Autism. *J Autism Dev Disord*. 2011 May 10. PubMed PMID: 21556968. Epub 2011/05/11. Eng.
242. Curtin C, Anderson SE, Must A, Bandini L. The prevalence of obesity in children with autism: a secondary data analysis using nationally representative data from the National Survey of Children's Health. *BMC Pediatr*. 2010;10:11. PubMed PMID: 20178579. Pubmed Central PMCID: 2843677. Epub 2010/02/25. eng.
243. Chen AY, Kim SE, Houtrow AJ, Newacheck PW. Prevalence of obesity among children with chronic conditions. *Obesity (Silver Spring)*. 2010 Jan;18(1):210-3. PubMed PMID: 19521350. Epub 2009/06/13. eng.
244. Evans C, Dunstan RH, Rothkirch T, Roberts TK, Reichelt KL, Cosford R, et al. Altered amino acid excretion in children with autism. *Nutr Neurosci*. 2008 Feb;11(1):9-17. PubMed PMID: 18510798. Epub 2008/05/31. eng.
245. Xia W, Zhou Y, Sun C, Wang J, Wu L. A preliminary study on nutritional status and intake in Chinese children with autism. *Eur J Pediatr*. 2010 Oct;169(10):1201-6. PubMed PMID: 20422215. Epub 2010/04/28. eng.
246. Arnold GL, Hyman SL, Mooney RA, Kirby RS. Plasma amino acids profiles in children with autism: potential risk of nutritional deficiencies. *J Autism Dev Disord*. 2003 Aug;33(4):449-54. PubMed PMID: 12959424. Epub

2003/09/10. eng.

247. Hediger ML, England LJ, Molloy CA, Yu KF, Manning-Courtney P, Mills JL. Reduced bone cortical thickness in boys with autism or autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord*. 2008 May;38(5):848-56. PubMed PMID: 17879151. Epub 2007/09/20. eng.

248. Latif A, Heinz P, Cook R. Iron deficiency in autism and Asperger syndrome. *Autism*. 2002 Mar;6(1):103-14. PubMed PMID: 11918106. Epub 2002/03/29. eng.

249. Dosman CF, Brian JA, Drmic IE, Senthilselvan A, Harford MM, Smith RW, et al. Children with autism: effect of iron supplementation on sleep and ferritin. *Pediatr Neurol*. 2007 Mar;36(3):152-8. PubMed PMID: 17352947. Epub 2007/03/14. eng.

250. Herndon AC, DiGuseppi C, Johnson SL, Leiferman J, Reynolds A. Does nutritional intake differ between children with autism spectrum disorders and children with typical development? *J Autism Dev Disord*. 2009 Feb;39(2):212-22. PubMed PMID: 18600441. Epub 2008/07/05. eng.

251. Carvalho NF, Kenney RD, Carrington PH, Hall DE. Severe nutritional deficiencies in toddlers resulting from health food milk alternatives. *Pediatrics*. 2001 Apr;107(4):E46. PubMed PMID: 11335767. Epub 2001/05/23. eng.

252. Cornish E. Gluten and casein free diets in autism: a study of the effects

on food choice and nutrition. *J Hum Nutr Diet*. 2002 Aug;15(4):261-9. PubMed PMID: 12153499. Epub 2002/08/03. eng.

253. Twachtman-Reilly J, Amaral SC, Zebrowski PP. Addressing feeding disorders in children on the autism spectrum in school-based settings: physiological and behavioral issues. *Lang Speech Hear Serv Sch*. 2008 Apr;39(2):261-72. PubMed PMID: 18420528. Epub 2008/04/19. eng.

254. Medeiros LC, Speridiao PG, Sdepanian VL, Fagundes-Neto U, Morais MB. [Nutrient intake and nutritional status of children following a diet free from cow's milk and cow's milk by-products]. *J Pediatr (Rio J)*. 2004 Sep-Oct;80(5):363-70. PubMed PMID: 15505731. Epub 2004/10/27. Ingestao de nutrientes e estado nutricional de criancas em dieta isenta de leite de vaca e derivados. por.

255. Rimland B. The differentiation of childhood psychoses: an analysis of checklists for 2,218 psychotic children. *J Autism Child Schizophr*. 1971 Apr-Jun;1(2):161-74. PubMed PMID: 5172390. Epub 1971/04/01. eng.

256. Reichelt KL, Hole K, Hamberger A, Saelid G, Edminson PD, Braestrup CB, et al. Biologically active peptide-containing fractions in schizophrenia and childhood autism. *Adv Biochem Psychopharmacol*. 1981;28:627-43. PubMed PMID: 7010949. Epub 1981/01/01. eng.

257. Gilberg C, Trygstad O, Foss I. Childhood psychosis and urinary excretion of peptides and protein-associated peptide complexes. *J Autism Dev Disord*.

1982 Sep;12(3):229-41. PubMed PMID: 7153198. Epub 1982/09/01. eng.

258. Foss I, Hagberg B, Trygstad O. Chromatographic profiles at E-280 nm for urinary precipitates in morbus Rett. *Brain Dev.* 1985;7(3):345-8. PubMed PMID: 4061770. Epub 1985/01/01. eng.

259. Solaas KM, Skjeldal O, Gardner ML, Kase FB, Reichelt KL. Urinary peptides in Rett syndrome. *Autism.* 2002 Sep;6(3):315-28. PubMed PMID: 12212921. Epub 2002/09/06. eng.

260. Gilroy JJ, Ferrier IN, Crow TJ, Rowell FJ. Urinary chromatographic profiles in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 1990 May 15;27(10):1127-32. PubMed PMID: 2340322. Epub 1990/05/15. eng.

261. Reichelt KL, Teigland-Gjerstad B. Decreased urinary peptide excretion in schizophrenic patients after neuroleptic treatment. *Psychiatry Res.* 1995 Sep 29;58(2):171-6. PubMed PMID: 8570770. Epub 1995/09/29. eng.

262. Liu Y, Heiberg T, Reichelt KL. Towards a possible aetiology for depressions? *Behav Brain Funct.* 2007;3:47. PubMed PMID: 17868435. Pubmed Central PMCID: 2063501. Epub 2007/09/18. eng.

263. Dohan FC. Genetic hypothesis of idiopathic schizophrenia: its exorphin connection. *Schizophr Bull.* 1988;14(4):489-94. PubMed PMID: 2851166. Epub 1988/01/01. eng.

264. Zioudrou C, Streaty RA, Klee WA. Opioid peptides derived from food proteins. The exorphins. *J Biol Chem*. 1979 Apr 10;254(7):2446-9. PubMed PMID: 372181. Epub 1979/04/10. eng.
265. Brantl V, Teschemacher H. A material with opioid activity in bovine milk and milk products. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1979 Apr;306(3):301-4. PubMed PMID: 471082. Epub 1979/04/30. eng.
266. Loukas S, Varoucha D, Zioudrou C, Streaty RA, Klee WA. Opioid activities and structures of alpha-casein-derived exorphins. *Biochemistry*. 1983 Sep 13;22(19):4567-73. PubMed PMID: 6313043. Epub 1983/09/13. eng.
267. Reichelt KL. Dialysis in schizophrenia: successful only in a subtype? *Schizophr Res*. 1996 May;19(2-3):223-4. PubMed PMID: 8789922. Epub 1996/05/01. eng.
268. Hemmings WA. The entry into the brain of large molecules derived from dietary protein. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1978 Feb 23;200(1139):175-92. PubMed PMID: 24851. Epub 1978/02/23. eng.
269. Reichelt WH, Ek J, Stensrud M, Reichelt KL. Peptide excretion in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1998 Mar;26(3):305-9. PubMed PMID: 9523866. Epub 1998/04/02. eng.
270. Ek J, Stensrud M, Reichelt KL. Gluten-free diet decreases urinary peptide levels in children with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1999

Sep;29(3):282-5. PubMed PMID: 10467992. Epub 1999/09/01. eng.

271. Nygaard E, Reichelt KL, Fagan JF. The relation between the psychological functioning of children with Down syndrome and their urine peptide levels and levels of serum antibodies to food proteins. *Downs Syndr Res Pract*. 2001 Jul;6(3):139-45. PubMed PMID: 11501218. Epub 2001/08/15. eng.

272. Israngkun PP, Newman HA, Patel ST, Duruibe VA, Abou-Issa H. Potential biochemical markers for infantile autism. *Neurochem Pathol*. 1986 Aug;5(1):51-70. PubMed PMID: 3561894. Epub 1986/08/01. eng.

273. Le Couteur A, Trygstad O, Evered C, Gillberg C, Rutter M. Infantile autism and urinary excretion of peptides and protein-associated peptide complexes. *J Autism Dev Disord*. 1988 Jun;18(2):181-90. PubMed PMID: 3410809. Epub 1988/06/01. eng.

274. Alcorn A, Berney T, Bretherton K, Mills M, Savery D, Shattock P. Urinary compounds in autism. *J Intellect Disabil Res*. 2004 Mar;48(Pt 3):274-8. PubMed PMID: 15025671. Epub 2004/03/18. eng.

275. Sponheim E, Myhre AM, Reichelt KL, Aalen OO. [Urine peptide patterns in children with milder types of autism]. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2006 May 25;126(11):1475-7. PubMed PMID: 16732341. Epub 2006/05/30. Peptidmonstre i urin hos barn med mildere former for autisme. nor.

276. Reichelt KL, Saelid G, Lindback T, Boler JB. Childhood autism: a complex disorder. *Biol Psychiatry*. 1986 Nov;21(13):1279-90. PubMed PMID: 3756276. Epub 1986/11/01. eng.
277. Reichelt KL, Knivsberg AM. The possibility and probability of a gut-to-brain connection in autism. *Ann Clin Psychiatry*. 2009 Oct-Dec;21(4):205-11. PubMed PMID: 19917211. Epub 2009/11/18. eng.
278. Dettmer K, Hanna D, Whetstone P, Hansen R, Hammock BD. Autism and urinary exogenous neuropeptides: development of an on-line SPE-HPLC-tandem mass spectrometry method to test the opioid excess theory. *Anal Bioanal Chem*. 2007 Aug;388(8):1643-51. PubMed PMID: 17520243. Epub 2007/05/24. eng.
279. Cass H, Gringras P, March J, McKendrick I, O'Hare AE, Owen L, et al. Absence of urinary opioid peptides in children with autism. *Arch Dis Child*. 2008 Sep;93(9):745-50. PubMed PMID: 18337276. Epub 2008/03/14. eng.
280. Kaufman J, Birmaher B, Brent DA, Ryan ND, Rao U. K-Sads-PI. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2000 Oct;39(10):1208. PubMed PMID: 11026169. Epub 2000/10/12. eng.
281. Lord C, Risi S, Lambrecht L, Cook EH, Jr., Leventhal BL, DiLavore PC, et al. The autism diagnostic observation schedule-generic: a standard measure of social and communication deficits associated with the spectrum of autism. *J Autism Dev Disord*. 2000 Jun;30(3):205-23. PubMed PMID: 11055457. Epub

2000/10/31. eng.

282. Caplan A, Walker L, Rasquin A. Development and preliminary validation of the questionnaire on pediatric gastrointestinal symptoms to assess functional gastrointestinal disorders in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005 Sep;41(3):296-304. PubMed PMID: 16131984. Epub 2005/09/01. eng.

283. Henschen A, Lottspeich F, Brantl V, Teschemacher H. Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). II. Structure of active components from bovine casein peptone. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1979 Sep;360(9):1217-24. PubMed PMID: 511111. Epub 1979/09/01. eng.

284. Brantl V, Teschemacher H, Henschen A, Lottspeich F. Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1979 Sep;360(9):1211-6. PubMed PMID: 511110. Epub 1979/09/01. eng.

285. Mierke DF, Nossner G, Schiller PW, Goodman M. Morphiceptin analogs containing 2-aminocyclopentane carboxylic acid as a peptidomimetic for proline. *Int J Pept Protein Res.* 1990 Jan;35(1):35-45. PubMed PMID: 2323882. Epub 1990/01/01. eng.

286. Klintwall L, Holm A, Eriksson M, Carlsson LH, Olsson MB, Hedvall A, et al. Sensory abnormalities in autism A brief report. *Res Dev Disabil.* 2011 Mar-Apr;32(2):795-800. PubMed PMID: 21111574. Epub 2010/11/30. eng.

287. Breau LM, Camfield CS. The relation between children's pain behaviour and developmental characteristics: a cross-sectional study. *Dev Med Child Neurol*. 2011 Feb;53(2):e1-7. PubMed PMID: 21121907. Epub 2010/12/03. eng.
288. Messmer RL, Nader R, Craig KD. Brief report: judging pain intensity in children with autism undergoing venepuncture: the influence of facial activity. *J Autism Dev Disord*. 2008 Aug;38(7):1391-4. PubMed PMID: 18161016. Epub 2007/12/28. eng.
289. Tordjman S, Antoine C, Cohen DJ, Gauvain-Piquard A, Carlier M, Roubertoux P, et al. [Study of the relationships between self-injurious behavior and pain reactivity in infantile autism]. *Encephale*. 1999 Mar-Apr;25(2):122-34. PubMed PMID: 10370885. Epub 1999/06/17. Etude des conduites auto-agressives, de la reactivite a la douleur et de leurs interrelations chez les enfants autistes. fre.
290. Cascio C, McGlone F, Folger S, Tannan V, Baranek G, Pelphrey KA, et al. Tactile perception in adults with autism: a multidimensional psychophysical study. *J Autism Dev Disord*. 2008 Jan;38(1):127-37. PubMed PMID: 17415630. Pubmed Central PMCID: 2185746. Epub 2007/04/07. eng.
291. Parellada M MC, Pezot MJ, Pina-Camacho L, Gonzalez-Vioque E, Arango C. The neurobiology of Autism Spectrum Disorders. *European Psychiatry* (in press). 2013.
292. Carr EG, Owen-Deschryver JS. Physical illness, pain, and problem

behavior in minimally verbal people with developmental disabilities. J Autism Dev Disord. 2007 Mar;37(3):413-24. PubMed PMID: 16897378. Epub 2006/08/10. eng.

293. Adams JB, Johansen LJ, Powell LD, Quig D, Rubin RA. Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism--comparisons to typical children and correlation with autism severity. BMC Gastroenterol. 2011;11:22. PubMed PMID: 21410934. Pubmed Central PMCID: 3072352. Epub 2011/03/18. eng.

294. Jyonouchi H, Geng L, Streck DL, Toruner GA. Children with autism spectrum disorders (ASD) who exhibit chronic gastrointestinal (GI) symptoms and marked fluctuation of behavioral symptoms exhibit distinct innate immune abnormalities and transcriptional profiles of peripheral blood (PB) monocytes. J Neuroimmunol. 2011 Sep 15;238(1-2):73-80. PubMed PMID: 21803429. Epub 2011/08/02. eng.

295. Ghaem M, Armstrong KL, Trocki O, Cleghorn GJ, Patrick MK, Shepherd RW. The sleep patterns of infants and young children with gastro-oesophageal reflux. J Paediatr Child Health. 1998 Apr;34(2):160-3. PubMed PMID: 9588641. Epub 1998/05/20. eng.

296. Xue M, Brimacombe M, Chaaban J, Zimmerman-Bier B, Wagner GC. Autism spectrum disorders: concurrent clinical disorders. J Child Neurol. 2008 Jan;23(1):6-13. PubMed PMID: 18056691. Epub 2007/12/07. eng.

297. Wier ML, Yoshida CK, Odouli R, Grether JK, Croen LA. Congenital anomalies associated with autism spectrum disorders. *Dev Med Child Neurol*. 2006 Jun;48(6):500-7. PubMed PMID: 16700944. Epub 2006/05/17. eng.
298. Gurney JG, McPheeters ML, Davis MM. Parental report of health conditions and health care use among children with and without autism: National Survey of Children's Health. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2006 Aug;160(8):825-30. PubMed PMID: 16894082. Epub 2006/08/09. eng.
299. Wakefield AJ, Anthony A, Murch SH, Thomson M, Montgomery SM, Davies S, et al. Enterocolitis in children with developmental disorders. *Am J Gastroenterol*. 2000 Sep;95(9):2285-95. PubMed PMID: 11007230. Epub 2000/09/28. eng.
300. Wakefield AJ, Ashwood P, Limb K, Anthony A. The significance of ileo-colonic lymphoid nodular hyperplasia in children with autistic spectrum disorder. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2005 Aug;17(8):827-36. PubMed PMID: 16003132. Epub 2005/07/09. eng.
301. Ivanov AI. Structure and regulation of intestinal epithelial tight junctions: current concepts and unanswered questions. *Adv Exp Med Biol*. 2012;763:132-48. PubMed PMID: 23397622. Epub 2013/02/12. eng.
302. Kucharzik T, Williams IR. Neutrophil migration across the intestinal epithelial barrier--summary of in vitro data and description of a new transgenic mouse model with doxycycline-inducible interleukin-8 expression in intestinal

epithelial cells. *Pathobiology*. 2002;70(3):143-9. PubMed PMID: 12571418. Epub 2003/02/07. eng.

303. Lambeir AM, Durinx C, Scharpe S, De Meester I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2003 Jun;40(3):209-94. PubMed PMID: 12892317. Epub 2003/08/02. eng.

304. Boonacker EP, Wierenga EA, Smits HH, Van Noorden CJ. CD26/DPPIV signal transduction function, but not proteolytic activity, is directly related to its expression level on human Th1 and Th2 cell lines as detected with living cell cytochemistry. *J Histochem Cytochem*. 2002 Sep;50(9):1169-77. PubMed PMID: 12185194. Epub 2002/08/20. eng.

305. Durinx C, Lambeir AM, Bosmans E, Falmagne JB, Berghmans R, Haemers A, et al. Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum: soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. *Eur J Biochem*. 2000 Sep;267(17):5608-13. PubMed PMID: 10951221. Epub 2000/08/22. eng.

306. Yazbeck R, Howarth GS, Abbott CA. Dipeptidyl peptidase inhibitors, an emerging drug class for inflammatory disease? *Trends Pharmacol Sci*. 2009 Nov;30(11):600-7. PubMed PMID: 19837468. Epub 2009/10/20. eng.

307. Wang Y, Li G, Stanco A, Long JE, Crawford D, Potter GB, et al. CXCR4 and CXCR7 have distinct functions in regulating interneuron migration. *Neuron*.

2011 Jan 13;69(1):61-76. PubMed PMID: 21220099. Pubmed Central PMCID: 3025760. Epub 2011/01/12. eng.

308. Lai JC, Wlodarska M, Liu DJ, Abraham N, Johnson P. CD45 regulates migration, proliferation, and progression of double negative 1 thymocytes. *J Immunol.* 2010 Aug 15;185(4):2059-70. PubMed PMID: 20624943. Epub 2010/07/14. eng.

309. Sedo A, Duke-Cohan JS, Balaziová E, Sedová LR. Dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologs: contributing factors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis? *Arthritis Res Ther.* 2005;7(6):253-69. PubMed PMID: 16277701. Pubmed Central PMCID: 1297595. Epub 2005/11/10. eng.

310. Durinx C, Neels H, Van der Auwera JC, Naeyaerts K, Scharpe S, De Meester I. Reference values for plasma dipeptidyl-peptidase IV activity and their association with other laboratory parameters. *Clin Chem Lab Med.* 2001 Feb;39(2):155-9. PubMed PMID: 11341750. Epub 2001/05/09. eng.

311. Siegel MA, Jensen RA, Panksepp J. The prolonged effects of naloxone on play behavior and feeding in the rat. *Behav Neural Biol.* 1985 Nov;44(3):509-14. PubMed PMID: 4084192. Epub 1985/11/01. eng.

312. Guard HJ, Newman JD, Roberts RL. Morphine administration selectively facilitates social play in common marmosets. *Dev Psychobiol.* 2002 Jul;41(1):37-49. PubMed PMID: 12115289. Epub 2002/07/13. eng.

313. Kamenskii AA, Voskresenskaia OG, Dubynin VA, Levitskaia NG. [Dependence of neuropeptide physiological effects on a route of administration]. Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova. 2001 Nov;87(11):1493-501. PubMed PMID: 11816281. Epub 2002/01/31. Zavisimost' fiziologicheskikh effectov riada neuropeptidov ot puti vvedeniia. rus.
314. Dubynin VA, Malinovskaya IV, Ivleva YA, Andreeva LA, Kamenskii AA, Ashmarin IP. Delayed behavioral effects of beta-casomorphin-7 depend on age and gender of albino rat pups. Bull Exp Biol Med. 2000 Nov;130(11):1031-4. PubMed PMID: 11182807. Epub 2001/02/22. eng.
315. Dziegielewska KM, Hinds LA, Møllgård K, Reynolds ML, Saunders NR. Blood-brain, blood-cerebrospinal fluid and cerebrospinal fluid-brain barriers in a marsupial (*Macropus eugenii*) during development. The Journal of physiology. 1988 Sep;403:367-88. PubMed PMID: 3075668. Pubmed Central PMCID: 1190718. Epub 1988/09/01. eng.
316. Moos T, Møllgård K. Cerebrovascular permeability to azo dyes and plasma proteins in rodents of different ages. Neuropathol Appl Neurobiol. 1993 Apr;19(2):120-7. PubMed PMID: 8316332. Epub 1993/04/01. eng.
317. Cornford EM, Braun LD, Oldendorf WH, Hill MA. Comparison of lipid-mediated blood-brain-barrier penetrability in neonates and adults. Am J Physiol. 1982 Sep;243(3):C161-8. PubMed PMID: 7114247. Epub 1982/09/01. eng.
318. Hsueh H, Kastin AJ, Wu X, Tu H, Pan W. Corticotropin-releasing

hormone receptor-1 in cerebral microvessels changes during development and influences urocortin transport across the blood-brain barrier. *Endocrinology*. 2010 Mar;151(3):1221-7. PubMed PMID: 20032050. Pubmed Central PMCID: 2840693. Epub 2009/12/25. eng.

319. Banks WA. Gut-brain communications: not the same at all ages. *Endocrinology*. 2010 Mar;151(3):852-4. PubMed PMID: 20172973. Epub 2010/02/23. eng.

320. Thomas SA, Abbruscato TJ, Hau VS, Gillespie TJ, Zsigo J, Hraby VJ, et al. Structure-activity relationships of a series of [D-Ala2]deltorphin I and II analogues; in vitro blood-brain barrier permeability and stability. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1997 May;281(2):817-25. PubMed PMID: 9152390.

321. Gao B, Hagenbuch B, Kullak-Ublick GA, Benke D, Aguzzi A, Meier PJ. Organic anion-transporting polypeptides mediate transport of opioid peptides across blood-brain barrier. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2000 Jul;294(1):73-9. PubMed PMID: 10871297. Epub 2000/06/28. eng.

322. King M, Su W, Chang A, Zuckerman A, Pasternak GW. Transport of opioids from the brain to the periphery by P-glycoprotein: peripheral actions of central drugs. *Nat Neurosci*. 2001 Mar;4(3):268-74. PubMed PMID: 11224543. Epub 2001/02/27. eng.

323. Xie R, Hammarlund-Udenaes M, de Boer AG, de Lange EC. The role of P-glycoprotein in blood-brain barrier transport of morphine: transcortical microdialysis studies in *mdr1a* (-/-) and *mdr1a* (+/+) mice. *Br J Pharmacol*. 1999 Oct;128(3):563-8. PubMed PMID: 10516633. Pubmed Central PMCID: 1571655. Epub 1999/10/12. eng.
324. Banks WA, Kastin AJ, Michals EA, Barrera CM. Stereospecific transport of Tyr-MIF-1 across the blood-brain barrier by peptide transport system-1. *Brain Res Bull*. 1990 Oct;25(4):589-92. PubMed PMID: 1980229. Epub 1990/10/01. eng.
325. Zadina JE, Kastin AJ, Ge LJ, Brantl V. Hemorphins, cytochrophins, and human beta-casomorphins bind to antiopiate (TYR-MIE-1) as well as opiate binding sites in rat brain. *Life Sci*. 1990;47(8):PL25-30. PubMed PMID: 1976197. Epub 1990/01/01. eng.
326. Pasi A, Mahler H, Linsel N, Bernasconi C, Messiha FS. beta-Casomorphin-immunoreactivity in the brain stem of the human infant. *Research communications in chemical pathology and pharmacology*. 1993 Jun;80(3):305-22. PubMed PMID: 8351411. Epub 1993/06/01. eng.
327. Kost NV, Sokolov OY, Kurasova OB, Dmitriev AD, Tarakanova JN, Gabaeva MV, et al. Beta-casomorphins-7 in infants on different type of feeding and different levels of psychomotor development. *Peptides*. 2009 Oct;30(10):1854-60. PubMed PMID: 19576256. Epub 2009/07/07. eng.

328. Ermisch A, Ruhle HJ, Neubert K, Hartrodt B, Landgraf R. On the blood-brain barrier to peptides: [3H]beta-casomorphin-5 uptake by eighteen brain regions in vivo. *J Neurochem.* 1983 Nov;41(5):1229-33. PubMed PMID: 6619862. Epub 1983/11/01. eng.
329. Banks WA, Kastin AJ. Peptides and the blood-brain barrier: lipophilicity as a predictor of permeability. *Brain Res Bull.* 1985 Sep;15(3):287-92. PubMed PMID: 2413968. Epub 1985/09/01. eng.
330. Lindstrom LH, Nyberg F, Terenius L, Bauer K, Besev G, Gunne LM, et al. CSF and plasma beta-casomorphin-like opioid peptides in postpartum psychosis. *Am J Psychiatry.* 1984 Sep;141(9):1059-66. PubMed PMID: 6087690. Epub 1984/09/01. eng.
331. Willemsen-Swinkels SH, Buitelaar JK, Weijnen FG, Thijssen JH, Van Engeland H. Plasma beta-endorphin concentrations in people with learning disability and self-injurious and/or autistic behaviour. *Br J Psychiatry.* 1996 Jan;168(1):105-9. PubMed PMID: 8770438. Epub 1996/01/01. eng.
332. Symons FJ, Thompson A, Rodriguez MC. Self-injurious behavior and the efficacy of naltrexone treatment: a quantitative synthesis. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2004;10(3):193-200. PubMed PMID: 15611982. Epub 2004/12/22. eng.
333. Elchaar GM, Maisch NM, Augusto LM, Wehring HJ. Efficacy and safety of naltrexone use in pediatric patients with autistic disorder. *Ann Pharmacother.*

2006 Jun;40(6):1086-95. PubMed PMID: 16735648. Epub 2006/06/01. eng.

334. Adachi J, Kumar C, Zhang Y, Olsen JV, Mann M. The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. *Genome Biol.* 2006;7(9):R80. PubMed PMID: 16948836. Pubmed Central PMCID: 1794545. Epub 2006/09/05. eng.

335. Schiffer E, Mischak H, Novak J. High resolution proteome/peptidome analysis of body fluids by capillary electrophoresis coupled with MS. *Proteomics.* 2006 Oct;6(20):5615-27. PubMed PMID: 16991199. Epub 2006/09/23. eng.

336. Mischak H, Julian BA, Novak J. High-resolution proteome/peptidome analysis of peptides and low-molecular-weight proteins in urine. *Proteomics Clin Appl.* 2007 Jul 10;1(8):792-804. PubMed PMID: 20107618. Pubmed Central PMCID: 2811330. Epub 2007/07/10. Eng.

337. Contreras Mdel M, Lopez-Exposito I, Hernandez-Ledesma B, Ramos M, Recio I. Application of mass spectrometry to the characterization and quantification of food-derived bioactive peptides. *J AOAC Int.* 2008 Jul-Aug;91(4):981-94. PubMed PMID: 18727560. Epub 2008/08/30. eng.

338. Wakefield AJ, Pittilo RM, Sim R, Cosby SL, Stephenson JR, Dhillon AP, et al. Evidence of persistent measles virus infection in Crohn's disease. *J Med Virol.* 1993 Apr;39(4):345-53. PubMed PMID: 8492105. Epub 1993/04/01. eng.

339. Thompson NP, Montgomery SM, Pounder RE, Wakefield AJ. Is measles vaccination a risk factor for inflammatory bowel disease? *Lancet*. 1995 Apr 29;345(8957):1071-4. PubMed PMID: 7715338. Epub 1995/04/29. eng.
340. Hermon-Taylor J, Ford J, Sumar N, Millar D, Doran T, Tizard M. Measles virus and Crohn's disease. *Lancet*. 1995 Apr 8;345(8954):922-3. PubMed PMID: 7707825. Epub 1995/04/08. eng.
341. Daszak P, Purcell M, Lewin J, Dhillon AP, Pounder RE, Wakefield AJ. Detection and comparative analysis of persistent measles virus infection in Crohn's disease by immunogold electron microscopy. *J Clin Pathol*. 1997 Apr;50(4):299-304. PubMed PMID: 9215145. Pubmed Central PMCID: 499879. Epub 1997/04/01. eng.
342. Chadwick N, Bruce IJ, Schepelmann S, Pounder RE, Wakefield AJ. Measles virus RNA is not detected in inflammatory bowel disease using hybrid capture and reverse transcription followed by the polymerase chain reaction. *J Med Virol*. 1998 Aug;55(4):305-11. PubMed PMID: 9661840. Epub 1998/07/14. eng.
343. Rouse A. Autism, inflammatory bowel disease, and MMR vaccine. *Lancet*. 1998 May 2;351(9112):1356. PubMed PMID: 9643818. Epub 1998/06/27. eng.
344. Uhlmann V, Martin CM, Sheils O, Pilkington L, Silva I, Killalea A, et al. Potential viral pathogenic mechanism for new variant inflammatory bowel

disease. *Mol Pathol*. 2002 Apr;55(2):84-90. PubMed PMID: 11950955. Pubmed Central PMCID: 1187154. Epub 2002/04/16. eng.

345. Walker-Smith J. A statement by Professor John Walker-Smith. *Lancet*. 2004 Mar 6;363(9411):822-3. PubMed PMID: 15022649. Epub 2004/03/17. eng.

346. Murch SH, Anthony A, Casson DH, Malik M, Berelowitz M, Dhillon AP, et al. Retraction of an interpretation. *Lancet*. 2004 Mar 6;363(9411):750. PubMed PMID: 15016483. Epub 2004/03/16. eng.

347. Harvey P. MMR and autism: the debate continues. *Lancet*. 2004 Feb 14;363(9408):568; author reply -9. PubMed PMID: 14975624. Epub 2004/02/21. eng.

348. Wakefield AJ, Harvey P, Linnell J. MMR--responding to retraction. *Lancet*. 2004 Apr 17;363(9417):1327-8; discussion 8. PubMed PMID: 15094289. Epub 2004/04/20. eng.

349. Jefferson T, Price D, Demicheli V, Bianco E. Unintended events following immunization with MMR: a systematic review. *Vaccine*. 2003 Sep 8;21(25-26):3954-60. PubMed PMID: 12922131. Epub 2003/08/19. eng.

350. Horton R. The lessons of MMR. *Lancet*. 2004 Mar 6;363(9411):747-9. PubMed PMID: 15016482. Epub 2004/03/16. eng.

351. Bernard S, Enayati A, Redwood L, Roger H, Binstock T. Autism: a novel

form of mercury poisoning. *Med Hypotheses*. 2001 Apr;56(4):462-71. PubMed PMID: 11339848. Epub 2001/05/08. eng.

352. Thompson WW, Price C, Goodson B, Shay DK, Benson P, Hinrichsen VL, et al. Early thimerosal exposure and neuropsychological outcomes at 7 to 10 years. *N Engl J Med*. 2007 Sep 27;357(13):1281-92. PubMed PMID: 17898097. Epub 2007/09/28. eng.

353. Meilleur AA, Fombonne E. Regression of language and non-language skills in pervasive developmental disorders. *J Intellect Disabil Res*. 2009 Feb;53(2):115-24. PubMed PMID: 19054269. Epub 2008/12/05. eng.

354. Kurland LT, Faro SN, Siedler H. Minamata disease. The outbreak of a neurologic disorder in Minamata, Japan, and its relationship to the ingestion of seafood contaminated by mercuric compounds. *World Neurol*. 1960 Nov;1:370-95. PubMed PMID: 13755288. Epub 1960/11/01. eng.

355. Madsen KM, Lauritsen MB, Pedersen CB, Thorsen P, Plesner AM, Andersen PH, et al. Thimerosal and the occurrence of autism: negative ecological evidence from Danish population-based data. *Pediatrics*. 2003 Sep;112(3 Pt 1):604-6. PubMed PMID: 12949291. Epub 2003/09/02. eng.

356. Schechter R, Grether JK. Continuing increases in autism reported to California's developmental services system: mercury in retrograde. *Arch Gen Psychiatry*. 2008 Jan;65(1):19-24. PubMed PMID: 18180424. Epub 2008/01/09. eng.

357. Uchiyama T, Kurosawa M, Inaba Y. MMR-vaccine and regression in autism spectrum disorders: negative results presented from Japan. *J Autism Dev Disord*. 2007 Feb;37(2):210-7. PubMed PMID: 16865547. Epub 2006/07/26. eng.
358. Smeeth L, Cook C, Fombonne E, Heavey L, Rodrigues LC, Smith PG, et al. MMR vaccination and pervasive developmental disorders: a case-control study. *Lancet*. 2004 Sep 11-17;364(9438):963-9. PubMed PMID: 15364187. Epub 2004/09/15. eng.
359. Lazoff T, Zhong L, Piperni T, Fombonne E. Prevalence of pervasive developmental disorders among children at the English Montreal School Board. *Can J Psychiatry*. 2010 Nov;55(11):715-20. PubMed PMID: 21070699. Epub 2010/11/13. eng.
360. Madsen KM, Hviid A, Vestergaard M, Schendel D, Wohlfahrt J, Thorsen P, et al. A population-based study of measles, mumps, and rubella vaccination and autism. *N Engl J Med*. 2002 Nov 7;347(19):1477-82. PubMed PMID: 12421889. Epub 2002/11/08. eng.



FUNDACIÓN
MUTUAMADRILEÑA

cibersam
Centro de Investigación Biomédica En Red
de Salud Mental

 Hospital General
Universitario
Gregorio Marañón
SaludMadrid
Comunidad de Madrid